



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

NATALI SILVA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DE DANOS AO DNA, ALTERAÇÕES NUCLEARES E  
PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS 1 (MCP-1) EM  
INDIVÍDUOS COM INDICAÇÃO PARA CIRURGIA BARIÁTRICA**

FLORIANÓPOLIS

2020

Natali Silva Cardoso

**AVALIAÇÃO DE DANOS AO DNA, ALTERAÇÕES NUCLEARES E PROTEÍNA  
QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS 1 (MCP-1) EM INDIVÍDUOS COM  
INDICAÇÃO PARA CIRURGIA BARIÁTRICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva Cardoso, Natali

Avaliação de danos ao DNA, alterações nucleares e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em indivíduos com indicação para cirurgia bariátrica / Natali Silva Cardoso ; orientador, Sharbel Weidner Maluf, 2020.

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Obesidade. 3. Dano de DNA. 4. Alterações nucleares. 5. Inflamação. I. Weidner Maluf, Sharbel. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Natali Silva Cardoso

**Avaliação de danos ao DNA, alterações nucleares e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em indivíduos com indicação para cirurgia bariátrica**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa, Dra. Simone Van de Sande Lee  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Membro titular)

Profa, Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Membro titular)

Prof, Dr. Sharbel Weidner Maluf  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Presidente)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

---

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa

---

Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf  
Orientador

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2020.

Este trabalho é dedicado a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos pacientes do serviço de cirurgia bariátrica do HU-UFSC e aos voluntários do grupo controle que participaram deste estudo, sem eles esta dissertação não seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf que aceitou me orientar durante este trabalho, por seu apoio, dedicação, compreensão, competência e por ter me ensinado tanto.

À minha mãe, minha irmã e ao meu namorado, por todo apoio, carinho e força.

Ao Dr. Emerson Marques por todo o apoio durante este trabalho.

À Michele Andrigueti e Paula Monteiro, por terem realizado as coletas deste estudo e serem sempre solícitas e queridas.

À Emerita Andrade de Moura por compartilhar todo seu conhecimento e me auxiliar durante as coletas, as entrevistas e questionários, análises imunológicas e de prontuários.

À Carolina Siqueira pelos auxílios nas técnicas de ELISA e regimentos do programa.

À Flora Maraslis por me ensinar as técnicas e me auxiliar mesmo que de longe.

À equipe do setor de genética do laboratório de análises clínicas do HU, por todo o aprendizado, amizade e auxílio na realização das técnicas. Em especial para Maria Luiza Rosa, por sempre me ajudar e as minhas colegas de pós-graduação Maria Eduarda Cerny, Melissa Mancini e Letícia Kraemer.

Aos meus amigos, por todo apoio e compreensão, especialmente a Ludmila Abreu e Paola Goulart por todo acolhimento.

Aos professores do programa de pós-graduação em farmácia (PGFAR) e outros programas da UFSC por compartilharem seu conhecimento nas disciplinas ofertadas.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabíola Monteiro pela disponibilização do seu laboratório e kits para realização das técnicas de ELISA. Agradeço também ser minha supervisora do estágio em docência, me permitindo acompanhar as aulas e ter me ensinado tanto.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a disponibilidade em avaliar o meu trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR).

Ao Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de mestrado.

E a todos que estiveram presentes durante estes anos, com sua amizade, compreensão, auxílio e ensinamentos. Muito obrigada!

## RESUMO

A obesidade é um problema de saúde mundial que vem crescendo ao longo dos anos, possuindo etiologia multifatorial, é associada a diversas comorbidades e está relacionada a um processo inflamatório crônico. Estudos demonstram que a inflamação gera um aumento de espécies reativas de oxigênio em indivíduos com obesidade. Assim, os estados de inflamação e estresse oxidativo podem contribuir para danos no DNA e instabilidade genômica, o que corrobora com a correlação entre obesidade e diferentes tipos de câncer. Existem diferentes abordagens terapêuticas para promover a perda de peso, mas a cirurgia bariátrica é a metodologia que demonstra maior eficácia na redução de peso e melhora metabólica em indivíduos com obesidade. Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar o dano de DNA, alterações celulares e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica e comparar com indivíduos saudáveis. Este é um estudo transversal. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 36 indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica (grupo caso) e 38 indivíduos saudáveis (grupo controle). O presente estudo avaliou a instabilidade genômica pelo teste do cometa e pelo teste do citoma de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular (CBMN), que permite a análise de frequências de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPB), *buds* nucleares (NBUD), células apoptóticas, células necróticas e estimativa do índice mitótico (IDN). O estado inflamatório também foi avaliado através da concentração sérica da proteína MCP-1. As mulheres foram predominantes nos dois grupos, com 80,6% no grupo caso e 84,2% no grupo controle, a média de idade foi de  $43,7 \pm 9,3$  anos no grupo caso e  $40,6 \pm 10,0$  no grupo controle. No grupo caso, 97,2% dos indivíduos apresentavam alguma comorbidade sendo que 75,0% tinham hipertensão, 63,9% diabetes *mellitus* tipo 2, 41,7% dislipidemia 36,1% apneia do sono, 30,6% dor nas articulações e 19,4% esteatose hepática. As concentrações séricas de MCP-1 estavam aumentadas no grupo caso, quando comparado ao controle ( $p < 0,001$ ) e no grupo caso houve aumento na MCP-1 em indivíduos que aumentaram o peso no último ano, quando comparados aqueles que perderam peso ( $p = 0,001$ ) ou permaneceram estáveis ( $p = 0,005$ ). Pelo ensaio cometa, observou-se que o dano total ao DNA foi aumentado nos indivíduos do grupo caso, quando comparado ao controle ( $p < 0,001$ ). Quanto ao CBMN, houve um aumento de MN ( $p = 0,007$ ), NPNP ( $p = 0,001$ ), NBUD ( $p < 0,001$ ) e células necróticas ( $p = 0,028$ ), no grupo caso, enquanto o IDN estava aumentado ( $p < 0,001$ ), no grupo controle. O processo inflamatório que ocorre na obesidade, aumenta os macrófagos no tecido adiposo, aumentando a concentração sérica de MCP-1. O processo inflamatório exacerbado na obesidade contribui para gerar lesões de DNA antes e após o mecanismo de reparo, o que aumenta o risco do desenvolvimento de câncer nos indivíduos com obesidade.

**Palavras-chave:** Obesidade; Dano de DNA; Alterações nucleares; Inflamação.

## ABSTRACT

Obesity is a worldwide health problem that has been growing over the years, having a multifactorial etiology, being associated with several comorbidities. It is related to a chronic inflammatory process and studies showed an increase in reactive oxygen species in obese individuals. Thus, the states of inflammation and oxidative stress may contribute to mechanisms associated with tumor development and maintenance, contributing to genomic instability, which corroborates with studies that showed a correlation between obesity and different types of cancer. There are different therapeutic approaches to promote weight loss, with bariatric surgery being the methodology that demonstrates greater effectiveness in weight reduction and metabolic improvement in individuals with comorbid obesity. Thus, the aim of this study was to assess DNA damage, cellular alterations and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) in individuals referred for bariatric surgery and to compare with healthy control subjects. This is a cross-sectional study. Peripheral blood samples were collected from 36 individuals referred for bariatric surgery (case group) and 38 eutrophics (control group). The present study evaluated the genomic instability by comet assay and Cytokinesis-block Micronucleus (CBMN) cytome assay, that allows the analysis of micronuclei frequencies (MN), nucleoplasmic bridges (NPB), nuclear buds (NBUD), apoptotic cells, necrotic cells and estimate mitotic index (IDN). The inflammatory state was also evaluated through MCP-1 serum concentration. Females were predominant in both groups, with 80.6% in the case group and 84.2% in the control group, the media of age was  $43.7 \pm 9.3$  years in the case group and  $40.6 \pm 10.0$  in the control group. In the case group 97.2% of individuals had some comorbidity, and 75.0% had hypertension, 63.9% type 2 diabetes mellitus, 41.7% dyslipidemia 36.1% sleep apnea, 30.6% joint pain and 19.4% steatosis. The serum concentration of MCP-1 was increased in the case group, when compared to the control ( $P < 0.001$ ) and in the case group there was an increase in MCP-1 in individuals who had increased weight in the last year when compared to those who lost weight ( $P = 0.001$ ) or remained stable ( $P = 0.005$ ). From the comet assay, it was observed that the total DNA damage was increased in the individuals of the case group, when compared to the control ( $P < 0.001$ ). As for CBMN, there was an increase in MN ( $P = 0.007$ ), NPNP ( $P = 0.001$ ), NBUD ( $P < 0.001$ ) and necrotic cells ( $P = 0.028$ ), while the IDN was decreased in case group ( $P < 0,001$ ). The inflammatory process that occurs in obesity, increases macrophages in adipose tissue, increasing the serum concentration of MCP-1. The inflammatory process exacerbated in obesity contributes to the generation of DNA damage before and after the repair mechanism, which increases the risk of cancer development in individuals with obesity.

**Keywords:** Obesity; DNA damage; Nuclear alteration; Inflammation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classes de dano observadas no ensaio cometa.....	21
Figura 2 – Alterações encontradas na técnica de CBMN.....	22
Figura 3 – Inflamação e formação de EROs na obesidade.....	24
Figura 4 – Células binucleadas com diferentes alterações contadas no teste CBMN. ....	30
Figura 5 – Fluxograma do estudo. ....	31
Figura 6 – Distribuição das concentrações séricas de MCP-1 nos grupos caso e controle. ....	36
Figura 7 – Aumento da distribuição de MCP-1 nos indivíduos do grupo caso em relação à variação de peso no último ano. ....	36
Figura 8 – Índice de dano total do ensaio cometa nos grupos caso e controle.....	37
Figura 9 – Frequência de células em necrose no grupo caso, de acordo com a realização de atividade física. ....	39
Figura 10 – Correlação entre MCP-1 e IMC considerando todos os participantes do estudo..	42
Figura 11 – Correlação entre MCP-1 e ITD considerando todos os participantes do estudo..	42
Figura 12 – Correlação entre MCP-1 e IDN considerando todos os participantes do estudo. .	43
Figura 13 – Correlação entre MCP-1 e NBUD considerando todos os participantes do estudo. ....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da população estudada .....	34
Tabela 2 – Frequência das comorbidades associadas à obesidade no grupo caso.....	35
Tabela 3 – Resultados da técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular .....	38
Tabela 4 – Correlações entre parâmetros quantitativos considerando todos os participantes do estudo.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG	8-hidroxi-2' desoxiguanosina
BER	<i>base excision repair</i> – reparo por excisão de base
CBMN	micronúcleo com bloqueio da citocinese celular – citoma
DM2	diabetes <i>mellitus</i> tipo w
DMSO	dimetilsulfóxido
DSBs	<i>double-strand breaks</i> – quebra de fita dupla
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
HR	<i>homologous recombination</i> – recombinação homóloga
IL	interleucina
ILC2	células linfóides inatas tipo 2
IDN	índice de divisão nuclear
ITD	índice total de dano
M1	macrófagos ativados por via clássica
M2	macrófagos ativados por via alternativa
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
MMR	<i>missmach repair</i> – reparo por <i>missmach</i>
MN	micronúcleo
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	agente nitrosante
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotídeo fosfato
NBUD	<i>buds</i> nucleares
NER	<i>nucleotide excision repair</i> – reparo por excisão de nucleotídeo
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i> – junção final não homóloga
NMP	<i>normal melting point</i> – ponto de fusão normal
NPNP	pontes nucleoplasmáticas
ONOOO <sup>-</sup>	peroxinitrito
ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitroperoxicarbonato
SAA	proteína amilóide sérica A
ssDNA	<i>single-strand DNA</i> – DNA de fita simples
SAOS	apneia obstrutiva do sono
TAB	tecido adiposo branco

TNF- $\alpha$  fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS.....	15
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
2.1	OBESIDADE .....	16
<b>2.1.1</b>	<b>Prevalência da obesidade.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Tratamentos .....</b>	<b>17</b>
2.2	OBESIDADE E INFLAMAÇÃO .....	18
2.3	INSTABILIDADE GENÔMICA.....	19
<b>2.3.1</b>	<b>Marcadores de instabilidade genômica .....</b>	<b>20</b>
2.3.1.1	Ensaio cometa.....	20
2.3.1.2	Micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (Cytome - CBMN).....	21
<b>2.3.2</b>	<b>Inflamação e instabilidade genômica.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Obesidade e dano de DNA .....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>25</b>
3.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	25
3.2	CASUÍSTICA .....	25
<b>3.2.1</b>	<b>Desenho amostral .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Crítérios de inclusão e exclusão .....</b>	<b>25</b>
3.3	COLETAS, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS ....	26
3.4	DADOS CLÍNICOS.....	26
3.5	DETERMINAÇÃO DE MCP-1 .....	26
3.6	ENSAIO COMETA .....	27
<b>3.6.1</b>	<b>Preparação das lâminas .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Eletroforese de célula única.....</b>	<b>27</b>

<b>3.6.3</b>	<b>Coloração das lâminas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Leitura das lâminas .....</b>	<b>28</b>
3.7	TÉCNICA DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE CELULAR (CBMN).....	29
<b>3.7.1</b>	<b>Cultura celular.....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Preparação das lâminas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Leitura das lâminas .....</b>	<b>30</b>
3.8	FLUXOGRAMA.....	30
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	PERFIL DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	33
<b>4.1.1</b>	<b>Comorbidades.....</b>	<b>34</b>
4.2	PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS 1 (MCP-1).....	35
4.3	MARCADORES DE DANO DE DNA .....	37
<b>4.3.1</b>	<b>Ensaio Cometa .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular .....</b>	<b>37</b>
4.4	CORRELAÇÕES .....	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
	<b>APÊNDICE A – Curva de calibração MCP-1 .....</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos .....</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO C –Questionário aplicado no grupo caso .....</b>	<b>58</b>
	<b>Identificação, hábitos e fatores socioeconômicos:.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO D – Questionário aplicado no grupo controle.....</b>	<b>60</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade abrange etiologia multifatorial envolvendo fatores ambientais, socioeconômicos, psicossociais, genéticos, metabólicos e neurológicos. Em 2016 foi estimado que a prevalência mundial de sobrepeso em adultos era de 36%, enquanto para obesidade era 15%, sendo considerada um problema de saúde mundial (WHO, 2018). Diversas comorbidades estão associadas a obesidade, tais como hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia, osteoartrite, apneia obstrutiva do sono (SAOS), esteatose hepática não alcoólica e câncer. Dentre as opções de tratamento, a cirurgia bariátrica promove uma perda de peso acentuada, reduzindo as complicações associadas ao excesso de peso (ABESO, 2016).

Uma inflamação crônica e de baixo grau está associada à obesidade, no qual o tecido adiposo hipertrofiado apresenta macrófagos ativados pela via clássica (M1). Sendo assim, o tecido adiposo de indivíduos com obesidade apresenta característica pró-inflamatória, que tem como característica macrófagos que secretam citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), as interleucinas 6 e 1 (IL-6 e IL-1) e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (LACKEY; OLEFSKY, 2016; REILLY; SALTIEL, 2017). A inflamação colabora com o desenvolvimento de comorbidades como a resistência a ação da insulina e o aumento da concentração de ácidos graxos. Além disto, a inflamação aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a um *status* de estresse oxidativo (MANNA; JAIN, 2015).

A inflamação e EROs podem gerar modificações na estrutura do DNA, gerando lesões como perda de bases e quebras de fita de DNA. As lesões no DNA podem resultar em mudanças na sequência de nucleotídeos até ganho, rearranjo ou perda cromossômica, podendo prejudicar a transcrição e replicação do DNA. Lesões ao DNA podem levar a morte celular, e quando não reparadas, podem resultar em mutações permanentes. Sendo assim, a inflamação e o estresse oxidativo podem gerar uma instabilidade genômica nestes indivíduos, podendo levar ao desenvolvimento de câncer (DESAULNIERS et al., 2015; MARTA; MICHAŁ; GRAŻYNA, 2019).

Neste contexto, a avaliação da inflamação e dano de DNA antes e após o mecanismo de reparo, assim como a correlação entre dano de DNA e inflamação, podem auxiliar no conhecimento sobre a obesidade e sua respectiva associação com o câncer. Posto isto, o objetivo

deste estudo foi avaliar comparativamente as alterações nucleares, a mutagenicidade e a genotoxicidade, bem como, as concentrações séricas de MCP-1 em indivíduos com obesidade.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o dano de DNA, alterações nucleares e as concentrações séricas da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em sangue periférico de indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, em Florianópolis nos anos de 2018 e 2019.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar as concentrações séricas de MCP-1 em indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (casos) e comparar com indivíduos saudáveis (controles);
- b) Determinar os índices de quebras de fita simples, quebras de fita dupla e de alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino das fitas de DNA, obtidos a partir do ensaio cometa e comparar entre os grupos;
- c) Determinar as frequências de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos (*buds*) nucleares, células apoptóticas, células necróticas e o índice de divisão nuclear, obtidas a partir da técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese celular e comparar entre os grupos;
- d) Analisar a correlação entre os resultados das técnicas realizadas e os fatores clínicos obtidos a partir de questionário e consulta de prontuários.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para realização da revisão bibliográfica foram utilizadas as bases de dados online PubMed e Scielo, além de livros e periódicos. Os assuntos pesquisados foram obesidade, inflamação, dano de DNA e instabilidade genômica.

### 2.1 OBESIDADE

Segundo a organização mundial da saúde, obesidade e sobrepeso são definidos como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que consiste no acúmulo de triagliceróis no tecido adiposo (WHO, 2018). A etiologia da obesidade é de característica multifatorial, envolvendo fatores socioeconômicos, ambientais, genéticos, neurológicos e psicossociais, tendo como premissa básica um desbalanço entre o consumo e o gasto energético (BHUPATHIRAJU; HU, 2016; GONZÁLEZ-MUNIESA et. al., 2017). O consumo e o gasto energético são regulados pelo sistema endócrino e neurológico (MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014) podendo sofrer alterações ambientais dependendo da qualidade da dieta, nível de atividade física, microbiota intestinal, desreguladores endócrinos, medicamentos e efeitos epigenéticos (MCALLISTER et al., 2009).

A obesidade está associada com o desenvolvimento de comorbidades como hipertensão, infarto agudo do miocárdio, DM2, dislipidemia, esteatose hepática não alcoólica, osteoartrite, SAOS, doença de Alzheimer, depressão (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017; WHO, 2018). Também está associada a alguns tipos de câncer, como o de cólon, mama, endométrio, vesícula biliar renal, estômago, pâncreas e fígado (CALLE; KAAKS, 2004). Estas complicações diminuem a qualidade e a expectativa de vida. Estudos demonstraram que indivíduos com obesidade têm maior risco de morte precoce quando comparados a indivíduos com índice de massa corporal (IMC) entre 18 kg/m<sup>2</sup> e 24,9 kg/m<sup>2</sup> (CORNIER et al., 2011).

A classificação de obesidade e sobrepeso se dá a partir do IMC, um cálculo matemático no qual o peso do indivíduo (em kg) é multiplicado por sua altura (m<sup>2</sup>), sendo que adultos com IMC maior ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup> são caracterizados com sobrepeso e acima de 30 kg/m<sup>2</sup> com obesidade (WHO, 2018). A obesidade pode ser classificada em três graus, sendo grau I (IMC de 30 a 34,9 kg/m<sup>2</sup>), grau II (IMC de 35 a 39,9 kg/m<sup>2</sup>) e grau III (IMC  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>) (ABESO, 2016).

### **2.1.1 Prevalência da obesidade**

A prevalência mundial de obesidade triplicou entre os anos de 1975 e 2016, ano em que foi estimado que mais de 39% dos adultos estavam com sobrepeso e 13% com obesidade. Quanto ao sexo, 39% dos homens e 40% mulheres tinham sobrepeso e 11% dos homens e 15% das mulheres tinham obesidade (WHO, 2018).

Segundo a pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizada em 2018, 55,7% dos adultos no Brasil apresentavam sobrepeso, enquanto 19,8% tinham obesidade. Os homens apresentavam mais sobrepeso (57,8%) do que as mulheres (53,9%), entretanto, as mulheres apresentavam mais obesidade (20,7%), quando comparado aos homens (18,7%) (VIGITEL, 2019).

A capital brasileira com menor prevalência de sobrepeso e obesidade é São Luís com 47,2% da população com sobrepeso e 15,7% com obesidade. Enquanto Cuiabá foi a capital com maior prevalência de sobrepeso (60,7% da população) e obesidade (23%). Em Florianópolis, 52,1% da população tem sobrepeso e 17,4% tem obesidade (VIGITEL, 2019).

### **2.1.2 Tratamentos**

Existem diferentes abordagens terapêuticas para promover a perda de peso, tais como, reeducação alimentar, dietas hipocalóricas, atividade física, farmacoterapia e métodos cirúrgicos. A cirurgia bariátrica é o método que se demonstra mais eficaz na redução de peso e melhora metabólica, incluindo seu papel na reversão da progressão de DM2 (URDAMPILLETA et al., 2012).

Apesar do benefício, a cirurgia apresenta riscos de complicações durante e pós-operatórias, como por exemplo, desnutrição proteica, deficiência de vitaminas, doenças osteometabólicas, entre outras. Sendo assim, a realização deste método é indicado apenas para adultos com idade entre 18 e 65 anos, IMC maior que 40 kg/m<sup>2</sup> ou 35 kg/m<sup>2</sup> que apresentem uma ou mais comorbidades graves e não tenham conseguido perder peso através de dietoterapia, psicoterapia, tratamento farmacológico e atividade física nos últimos dois anos (ABESO, 2016).

## 2.2 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

Em 1993, Hotamisligil e colaboradores identificaram uma alta expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa (*Tumour Necrosis Factor alfa* - TNF- $\alpha$ ) no tecido adiposo de roedores modelos de obesidade. Os animais que tinham receptores de TNF- $\alpha$  bloqueados apresentavam maior captação periférica de glicose em resposta à insulina, demonstrando que o TNF- $\alpha$ , não só estaria aumentado nos casos de obesidade, promovendo uma resposta pró-inflamatória no tecido adiposo, mas também estaria envolvido com a resistência à insulina, podendo levar ao desenvolvimento de DM2 (HOTAMISLIGIL.; SHARGIL; SPIEGELMAN, 1993).

Posteriormente, foi identificado o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de humanos e sua associação com a resistência à ação da insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGIL; SPIEGELMAN, 1993; KERN et al., 1995). Atualmente sabe-se que a obesidade está envolvida com um processo inflamatório crônico, contribuindo para sua manutenção e o desenvolvimento de comorbidades.

O tecido adiposo é permeado por células do sistema imunológico, que são responsáveis pela manutenção da integridade e sensibilidade hormonal dos adipócitos. Em animais saudáveis este ambiente opera em um estado anti-inflamatório (REILLY; SALTIEL, 2017). Os macrófagos em ambientes anti-inflamatórios são ativados por via alternativa (M2) através da IL-33 que irá induzir as células inatas do grupo 2 (ILC2). As células ILC2 por sua vez, irão produzir IL-5 e IL-13 atraindo eosinófilos que irão secretar IL-4 e manter o fenótipo M2, produzindo IL-10. A produção de IL-10 irá preservar a sensibilidade a ação da insulina e suprimir os sinais de lipólise, mantendo um ambiente anti-inflamatório e a flexibilidade metabólica dos adipócitos (FUJISAKA et al., 2009; LACKEY; OLEFSKY, 2016).

Em contrapartida, durante o estado de obesidade, os adipócitos possuem característica pró-inflamatória, que ocorre em resposta a sinalização de TNF e ácidos graxos livres, que irão secretar quimiocinas como MCP-1 e recrutar monócitos da circulação para o tecido. Os macrófagos serão diferenciados por via clássica (M1), que possui características pró-inflamatórias, secretando TNF e IL-1 $\beta$ , que irão colaborar com a manutenção do ambiente pró-inflamatório e a resistência à ação da insulina (LACKEY; OLEFSKY, 2016; REILLY; SALTIEL, 2017).

Outro fator que pode contribuir para o recrutamento de macrófagos e a inflamação do tecido adiposo é a proteína amiloide sérica A (SAA). A SAA é uma proteína de fase aguda, produzida majoritariamente pelo fígado, porém estudos já demonstraram ser produzida e liberada também pelos adipócitos (FILIPPIN-MONTEIRO et al., 2012; POITOU et al., 2009).

Esta proteína está associada a hipertrofia dos adipócitos que favorece a secreção de MCP-1 e aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-18. Além disto, sugere-se que a SAA induz TNF- $\alpha$  a estimular a lipólise e inibir a lipogênese, resultando no aumento da concentração de ácidos graxos livres (DI CESARE et al., 2016; PORTER STARR et al., 2019; SJÖHOLM et al., 2009).

Estudos demonstraram que a expressão gênica de MCP-1 estaria aumentada no tecido adiposo de indivíduos com obesidade, sendo a expressão da proteína MCP-1 maior no tecido adiposo visceral quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo em pacientes com obesidade (HARMAN-BOEHM et al., 2007). A concentração sérica de MCP-1 também se apresentou aumentada nos grupos com obesidade, quando comparados aos grupos controle em adultos (CATALÁN et al., 2007; KIM et al., 2006) e crianças (MATIA-GARCÍA et al., 2018), com uma correlação positiva entre as concentrações de MCP-1 e IMC (KIM et al., 2006).

### 2.3 INSTABILIDADE GENÔMICA

Causas endógenas e exógenas podem gerar modificações na estrutura do DNA. Estima-se que cada célula humana está sujeita a aproximadamente 70.000 lesões por dia (LINDAHL; BARNES, 2000), sendo que as quebras de fita simples de DNA (*single-strand DNA* – ssDNA) correspondem a 75% das lesões. Quebras de ssDNA podem ser convertidas em quebras de fita dupla de DNA (*Double-Strand Breaks* – DSBs), que acarretam danos mais graves, porém, menos frequentes. Estes danos podem ser resultado de danos oxidativos recorrentes do metabolismo, hidrólise celular e o processo inflamatório (KUMARI et al., 2008; LINDAHL; BARNES, 2000; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017). Outras alterações na estrutura do DNA são: oxidação ou alcalinação das bases de DNA, ligações covalentes entre bases de DNA (*crosslinks* DNA-DNA) ou proteínas (*crosslinks* DNA-proteína) (FRIEDBERG, 2008).

O sistema de reparo de DNA, reverte os danos antes que ocorram mutações permanentes no genoma. Os mecanismos de ação de reparo das quebras de ssDNA envolvem o reparo de bases modificadas a partir da excisão de bases (*Base Excision Repair* – BER), a detecção e reparo de bases incorporadas incorretamente durante a replicação (*Missmach Repair* – MMR) e o reparo por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide Excision Repair* – NER) (TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017). Para o reparo por BER e NER, é feita a remoção da lesão e a

sequência é restaurada por uma enzima DNA polimerase, que utilizará a fita não danificada como molde (AZQUETA et al., 2019).

O reparo de DBSs, é feito a partir da recombinação homóloga (*Homologous Recombination* – HR), que ocorre nas fases S/G2 do ciclo celular, no qual as regiões afetadas são trocadas por regiões equivalentes quando há a disponibilidade de uma das cromátides irmãs. Enquanto o mecanismo de junção final não homóloga (*Non-homologous End-joining* – NHEJ) religa as extremidades da fita, sem o uso de um modelo, podendo levar a inserções ou exclusões no ponto de fusão, sendo menos fidedigno que o reparo mediado por HR (AZQUETA et al., 2019; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

No caso de lesões irreparáveis, o mecanismo de ação é a morte celular. Se não reparadas, estas lesões podem induzir mutações, que ocorrerem em genes envolvidos no controle de reparo e/ou replicação de DNA, ciclo celular, divisão cromossômica e apoptose, podendo levar ao desenvolvimento de câncer e outras doenças (DESAULNIERS et al., 2015).

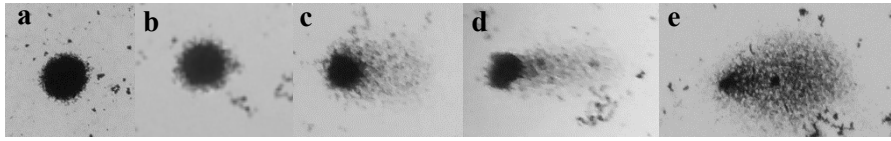
### **2.3.1 Marcadores de instabilidade genômica**

#### **2.3.1.1 Ensaio cometa**

O ensaio cometa é um biomarcador que quantifica lesões ao DNA passíveis de reparo decorrentes ssDNA, DBSs, *crosslinks* DNA-DNA, *crosslinks* DNA-proteínas e formação de sítios álcali-lábeis (BURLINSON et al., 2007), sendo um método altamente sensível, detectando baixas frequências de dano de DNA (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

Esta técnica é baseada em uma eletroforese de célula única, na qual o DNA danificado irá migrar para o ânodo após corrida eletroforética. Previamente à eletroforese, as células com agarose são dispostas sobre uma lâmina, que entrará em contato com uma solução de lise para remover membranas e histonas (AZQUETA et al., 2019). Depois a lâmina é imersa em uma solução alcalina, a fim de reverter os sítios álcali-lábeis em quebras. Assim, as quebras de DNA irão migrar para o ânodo da eletroforese. A intensidade do dano ao DNA é classificada em 4 classes, sendo 0 ausência de dano, 1 as células com dano mínimo, 2 as células com danos médios, 3 as células com danos intensos e 4 as células com danos máximos (Figura 1) (OLIVE; BANÁTH, 2006).

Figura 1 – Classes de dano observadas no ensaio cometa.



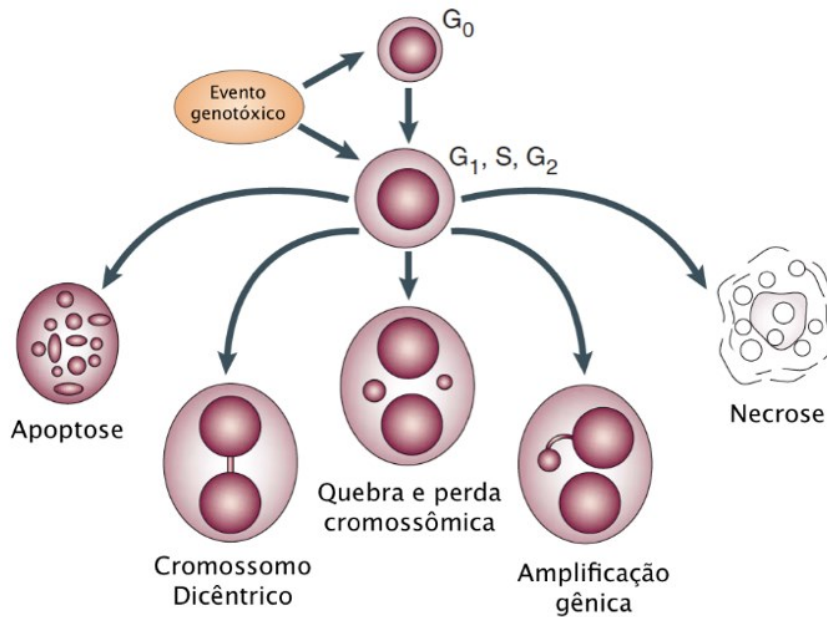
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A figura demonstra as classes de dano de DNA, após a corrida de eletroforese em célula única e coloração com prata. Foto de microscopia eletrônica no aumento de 200x. a: dano 0 (sem danos); b: dano 1 (dano mínimo); c: dano 2 (dano médio); d: dano 3 (dano intenso); e: dano 4 (dano máximo).

### 2.3.1.2 Micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (Cytome - CBMN)

Outro biomarcador para instabilidade genômica é a técnica de CBMN que foi descrita por Fenech e Morley em 1986 . O CBMN em linfócitos de sangue periférico, permite avaliar os danos de DNA que permaneceram após os mecanismos de reparo. Com o CBMN é possível identificar a presença de micronúcleos (MN) derivados de quebras ou perdas cromossômicas; pontes nucleoplasmáticas (NPNTs), provenientes do reparo incorreto de quebras de DNA ou fusões de porções finais dos telômeros; e *buds* nucleares (NBUDs), que são produtos da eliminação de DNA amplificado ou complexos de DNA reparado. Além disto, a partir de 2007, esta técnica passou a permitir a avaliação do índice mitótico, através da presença de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas e o *status* de viabilidade celular, por meio da análise da presença de células que estão no estado de apoptose ou necrose (Figura 1) (FENECH, 2007; FENECH et al., 2016). Sendo assim, as células são classificadas de acordo com o *status* de viabilidade (apoptose e necrose), *status* mitótico (células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas), e o dano e/ou instabilidade cromossômica (presença de MN, NBUD e NPNT) (FENECH, 2007).

Figura 2 – Alterações encontradas na técnica de CBMN.



Fonte: Adaptado de Fenech *et. al.*, 2007

A figura demonstra os eventos gerados por eventos citotóxicos que visualizados através da técnica de micronúcleo com bloqueio de citocinese celular. Podendo observar os eventos de apoptose, necrose, e a formação de micronúcleo através de quebras e perdas cromossômicas, *buds* através da amplificação gênica e ponte a partir de cromossomos dicêntricos.

### 2.3.2 Inflamação e instabilidade genômica

É estimado que a inflamação crônica contribui para aproximadamente 25% dos cânceres em humanos, visto que durante o processo inflamatório há a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), danificando biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (COUSSENS; WERB, 2002; HUSSAIN; HARRIS, 2007). As EROs e ERNs podem lesionar o DNA, formando lesões mutagênicas como 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e 8-nitroguanina, respectivamente, moléculas que estão associadas com o desenvolvimento da carcinogênese (HUH *et al.*, 2017).

Adipocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 promovem o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas que irão estimular a produção de EROs e ERNs via NADPH oxidases, principalmente as isoformas NOX1, NOX2 e NOX4 (USMAN; VOLPI, 2018). Macrófagos e neutrófilos também geram oxidantes como peroxinitrito (ONOOO<sup>-</sup>), nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e agente nitrosante (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (MARTA; MICHAŁ; GRAŻYNA, 2019; USMAN; VOLPI, 2018). Durante a peroxidação lipídica, produtos como eteno, propano e malondialdeído são formados, interagindo com o DNA e formando adutos e danificando a estrutura do DNA. EROs podem levar a lesões no DNA, como oxidação, alquilação, metilação, nitratação, dasaminação e quebras de ssDNA e DBSs ou *cross-links*.



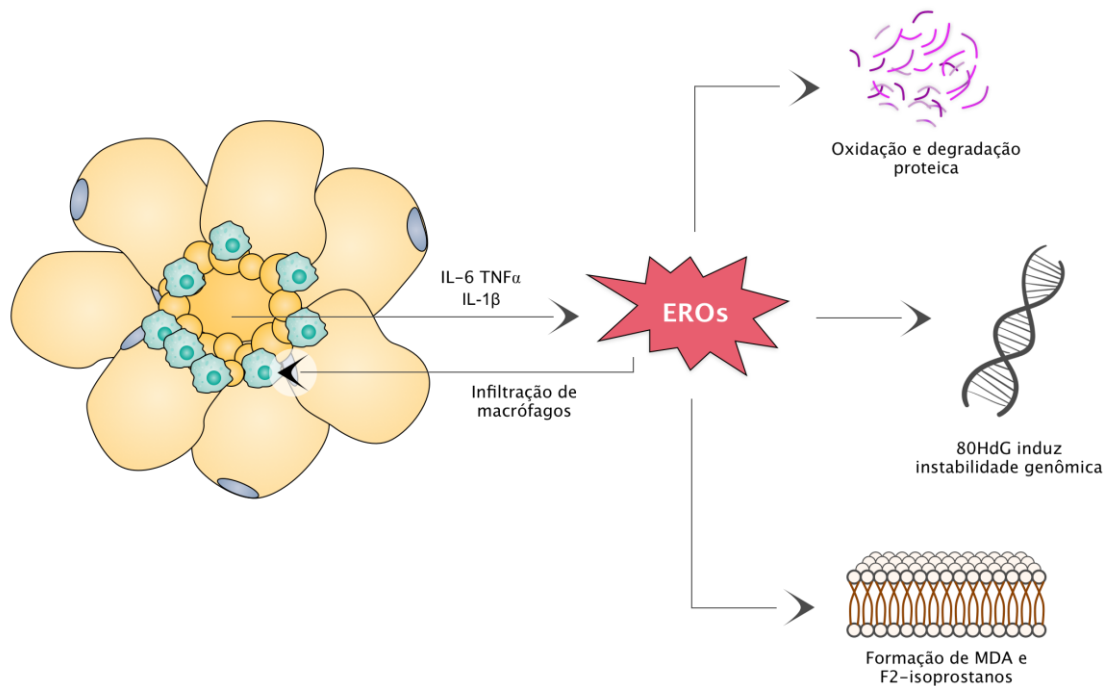
### 2.3.3 Obesidade e dano de DNA

Estudos evidenciaram que indivíduos com obesidade apresentam até duas vezes mais lesões de DNA, como quebra de ssDNA e DBSs em linfócitos quando comparado a indivíduos com peso normal, e foi encontrada uma correlação entre IMC e a frequência de dano de DNA (WŁODARCZYK; NOWICKA, 2019). A captação de ácidos graxos pelos adipócitos ativa NOX4 e induz a produção de EROs. O estudo de Han e colaboradores (2012) demonstrou que o silenciamento de NOX4 diminui a geração de EROs e inibe MCP-1 e a expressão de SAA em culturas de adipócitos demonstrando que pode haver um envolvimento entre NOX4 e a formação de EROs, MCP-1 e SAA.

Há um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos adipócitos, resultando em uma maior oxidação mitocondrial, visto que exposição de adipócitos e células musculares a altas concentrações de ácidos graxos livres, promove o aumento de EROs mitocondrial (WŁODARCZYK; NOWICKA, 2019). O estudo de Azarra e colaboradores (2016), demonstrou que linfócitos de indivíduos com obesidade apresentavam mais danos ao DNA por mitomicina C quando comparado a indivíduos saudáveis, demonstrando que pessoas com obesidade poderiam estar mais susceptíveis a danos de DNA não reparado. O 8-OHdG, é um marcador sensível para dano de DNA por dano oxidativo e vem sendo demonstrado que a concentração está aumentada na urina de ratos, camundongos, adultos e crianças com obesidade (CEJVANOVIC et al., 2016; HU et al., 2019; SELVARAJU et al., 2019).

A hipertrofia dos adipócitos durante a obesidade, leva a necrose, o que irá aumentar as concentrações da proteína MCP-1 que está envolvida no recrutamento de macrófagos para o tecido lesionado. Os macrófagos estimulam a formação de EROs via NADPH oxidase, podendo levar a oxidação e degradação proteica e formação de 8-OHdG, MDA e F2-isoprostanos que podem levar a alterações na estrutura do DNA. Além disso, a liberação de EROs favorece o recrutamento de macrófagos, sendo um ciclo que aumentará a inflamação e formação de EROs e produtos que podem levar a lesões no DNA (Figura 2) (CERDÁ et. al., 2014; MARTA; MICHAŁ; GRAŻYNA, 2019; USMAN; VOLPI, 2018).

Figura 3 – Inflamação e formação de EROs na obesidade.



Fonte: Adaptado de Cerdá et al. (2014)

Legenda: A figura ilustra a relação entre a infiltração de macrófagos e a formação de EROs na obesidade. IL: interleucina, TNF: Fator de necrose tumoral, EROs: Espécies Reativas de Oxigênio, 8OHdG: 8-oxi-desoxiguanosina

Além disto, estudos demonstraram distúrbios no mecanismo de reparo de DNA em pessoas com obesidade, como a correlação inversa entre IMC e NER e a inibição das enzimas de reparo pelo estresse oxidativo (KIDANE et al., 2014; TYSON et al., 2009). Portanto, a obesidade está envolvida com o aumento no dano de DNA e a diminuição dos mecanismos de reparo de DNA, podendo gerar instabilidade genômica e levar ao desenvolvimento de tumores. Estes dados corroboram a associação entre obesidade e diversos tipos de câncer, como adenocarcinoma de esôfago, mieloma múltiplo, gástrico, de cólon, reto, trato biliar, pâncreas, mama, endométrio, ovário e rim (KYRGIU et al., 2017). Além disto, a inflamação, hiperglicemia e dislipidemia que estão associadas a obesidade, podem colaborar com o desenvolvimento e manutenção tumoral (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; MAZZARELLA, 2015).

Neste contexto, objetivou-se avaliar os índices de dano de DNA antes e após o mecanismo de reparo, bem como a MCP-1 em indivíduos com obesidade e comparar com indivíduos saudáveis. Além de avaliar a correlação entre os parâmetros citados e os fatores clínicos.

### 3 METODOLOGIA

A metodologia engloba os aspectos éticos, delineamento do estudo, caracterização dos grupos, dados clínicos, as técnicas utilizadas e análises estatísticas.

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número do parecer 2.595.398 (ANEXO A). Os participantes receberam explicações a respeito do estudo e nos casos de aceite o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B) foi aplicado e assinado pelo participante, que recebeu uma cópia.

Em seguida, os participantes responderam a um questionário referente ao grupo caso (ANEXO C), ou controle (ANEXO D) de acordo com os critérios de inclusão de cada grupo. As perguntas dos questionários foram a respeito de dados sociodemográficos, uso de medicamentos, histórico de obesidade e/ou sobrepeso, história clínica do indivíduo e familiares, consumo de álcool, tabaco e restrições nutricionais.

#### 3.2 CASUÍSTICA

##### 3.2.1 Desenho amostral

Este estudo transversal determinou a concentração sérica de MCP-1 e marcadores de dano de DNA e alterações nucleares em sangue periférico de indivíduos encaminhados para a cirurgia bariátrica e indivíduos saudáveis. Foram incluídos 74 indivíduos neste estudo, sendo 36 no grupo de indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica (grupo caso) e 38 no grupo de indivíduos saudáveis (grupo controle).

Para a realização do cálculo amostral foi utilizado o *software* WinPepi 8.0, no qual foi considerado a variação encontrada nos indivíduos saudáveis nas técnicas utilizadas para um nível de significância de 0,05. Após aplicar estes parâmetros, o resultado do cálculo amostral foi de 62 indivíduos, sendo distribuídos como 31 em cada grupo.

##### 3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

No grupo caso foram incluídos os indivíduos com indicação para cirurgia bariátrica que estavam internados no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC)

no pré-operatório entre os anos de 2018 e 2019. Os critérios de inclusão foram adultos com idade entre 18 e 65 anos, que apresentavam  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Os indivíduos com históricos recentes (menos de cinco anos) de câncer, tratamento quimioterápico, radioterápico de hemodiálise foram excluídos do estudo.

Os critérios de inclusão para o grupo controle foram: ter mais de 18 anos, não ter histórico de obesidade, não ter feito cirurgia bariátrica, não fazer uso de mais de 3 doses semanais de bebida alcoólica e não ter diagnóstico atual ou passado de doenças crônicas e câncer. Os indivíduos com  $IMC$  menor que  $18,5 \text{ kg/m}^2$  e maior que  $25 \text{ kg/m}^2$  foram excluídos do estudo. O grupo controle foi composto de funcionários do serviço de patologia clínica do HU-UFSC, alunos de pós-graduação da UFSC e outras pessoas que se voluntariaram para participar do estudo. O grupo controle foi escolhido e pareado de acordo com a faixa etária e sexo dos participantes do grupo caso.

### 3.3 COLETAS, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue periférico foram coletadas por profissionais treinados para coleta de sangue por punção venosa. Foi coletado de cada participante 1 tubo de 4ml de sangue total com anticoagulante heparina (protegido da luz no momento da coleta) e 1 tubo seco de 8ml com gel separador para obtenção de soro.

Após a coleta, os tubos de soro foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos e o soro foi separado em alíquotas de 500 $\mu$ l e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até análise. As amostras de sangue total foram armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  e processadas conforme as técnicas do ensaio cometa e micronúcleo com bloqueio da citocinese celular (CBMN).

### 3.4 DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram obtidos a partir dos questionários aplicados em ambos os grupos. Os dados a respeito do uso de medicamentos, de suplementação vitamínica e comorbidades no grupo caso foram retirados da análise dos prontuários do HU-UFSC.

A mudança de peso no último ano foi extraída a partir de questionário recordatório. Foi considerado como atividade física os participantes que referiram fazer no mínimo 30 min de atividade física ao menos 3 vezes por semana.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DE MCP-1

A determinação de MCP-1 foi realizada em amostras de soro dos participantes de ambos os grupos. Para a determinação de MCP-1 foi utilizado conjunto diagnóstico BD OptEIA

(San Diego, CA). O conjunto consiste em um ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche e foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O cálculo da concentração foi realizado por interpolação em curva de calibração (Apêndice A), a sensibilidade do ensaio foi de 4,0 pg/mL.

### 3.6 ENSAIO COMETA

Esta técnica foi realizada conforme a descrita por Singh e colaboradores (1988) e adaptada por Tice e colaboradores (2000).

#### 3.6.1 Preparação das lâminas

Inicialmente foram confeccionadas lâminas com uma pré-cobertura de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point* ou NMP). A agarose foi diluída em água, aquecida em forno de micro-ondas e colocada em cubetas, nas quais as lâminas previamente lavadas são mergulhadas e um dos lados é limpo com papel absorvente e levadas a estufa por 50°C por 2 horas ou em temperatura ambiente por 12 horas, após este período as lâminas foram armazenadas em um local seco.

Com as lâminas prontas para uso, foi aquecida a agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* ou LMP) até aproximadamente 37°C em micro-ondas. Com uma micropipeta misturou-se 95 µl de agarose LMP e 5 µl de sangue heparinizado e disposto sobre lâmina com pré-cobertura de agarose NMP e imediatamente coberta por uma lamínula. O uso da lamínula tem a finalidade de misturar as duas camadas e evitar a formação de bolhas de ar. O material foi colocado horizontalmente em uma câmara úmida na geladeira por aproximadamente 5 minutos, para solidificação da agarose, após este período a lamínula é cuidadosamente retirada.

Após esta etapa, a lâmina foi colocada em uma cubeta contendo solução de lise gelada por um período mínimo de 2 horas e máximo de 2 semanas. A solução de lise é composta de 99 ml de solução de lise mãe (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) com 10 ml de DMSO e 1 ml de Triton x-100.

#### 3.6.2 Eletroforese de célula única

Para a eletroforese preparou-se um tampão alcalino (NaOH, EDTA 200 mM e água destilada em pH 10), utilizado a 4°C. As lâminas foram então retiradas da lise e posicionadas

sem brechas na cuba de eletroforese. O tampão de eletroforese foi adicionado, no qual as lâminas ficaram expostas por 20 minutos, este tempo de contato das lâminas com o tampão é necessário para que haja a separação das cadeias de DNA, e assim possam migrar em direção ao ânodo. Em seguida foi realizada a eletroforese por 20 minutos em geladeira, sob as condições de 25 V e 300 mA (ajustado através do volume de tampão).

Após a corrida eletroforética as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas 3 vezes com tampão de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5), com 5 minutos entre cada lavagem, logo em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada e deixadas para secar por no mínimo 2 horas a 37°C.

Para a fixação do material, as lâminas foram mergulhadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%), lavadas 3 vezes com água destilada e colocadas para secar por no mínimo 2 horas a 37°C.

Para cada eletroforese foi acrescentada ao menos uma lâmina de amostra tratada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM para ser utilizada como controle positivo (seguindo os mesmos passos que as demais lâminas).

### **3.6.3 Coloração das lâminas**

As lâminas foram coradas seguindo o método de coloração de prata descrito por Nadin e colaboradores (2001). Para a coloração, as lâminas foram reidratadas por 5 minutos em água destilada. A mistura das soluções A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%) foi feita imediatamente antes do uso. As lâminas foram colocadas em cubetas contendo a solução de corante A+B por aproximadamente 15 minutos com agitações a cada 5 minutos. Após atingir uma coloração acinzentada, as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1%) por 5 minutos, lavadas novamente com água destilada e depois deixadas em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram armazenadas até a análise.

### **3.6.4 Leitura das lâminas**

Foram confeccionadas duas lâminas por indivíduo, nas quais foram analisadas 50 células em cada. Para a análise cega por único observador, as identificações foram cobertas com etiquetas brancas e numeradas. As células foram observadas em microscópio óptico no aumento de 200 vezes. Regiões próximas às margens da lâmina ou bolhas de ar foram evitadas, devido a possibilidade de a migração ser prejudicada nestes locais.

A intensidade do dano de DNA foi classificada em 4 classes, sendo 0 ausência de dano, 1 as células com dano mínimo, 2 as células com danos médios, 3 as células com danos intensos e 4 as células com danos máximos, conforme demonstrado na (Figura 1). Os valores de 0 a 4 dos 100 núcleos analisados são somados, o que irá resultar no valor individual, podendo variar de 0 a 400 unidades arbitrárias.

### 3.7 TÉCNICA DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE CELULAR (CBMN)

Esta técnica foi adaptada do protocolo publicado por Fenech em 2007.

#### 3.7.1 Cultura celular

Para cultura celular, foram adicionadas de forma estéril 10 gotas de sangue total heparinizado em um tubo contendo 5 ml de meio de cultura contendo RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de fitohemaglutinina A. O tubo *falcon*, contendo a amostra e meio de cultura foi colocado em estufa a 37°C. Após 44 horas de cultura, foram adicionados citocalasina B (6µg/ml) e ao final das 72 horas, o tubo com a cultura foi centrifugado a 1500 rpm durante 6 minutos e o sobrenadante descartado, seguindo com a adição lenta de 5 ml de uma solução hipotônica aquecida a 37°C de KCL 0,075 M por 7 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 ml de solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1) e homogeneizado, após nova centrifugação o sobrenadante é descartado e são adicionados 5ml de solução fixadora lentamente, o material permaneceu na geladeira por no mínimo 10 minutos.

#### 3.7.2 Preparação das lâminas

Para confecção das lâminas foi realizada uma lavagem das hemácias com centrifugações seguidas da adição de solução fixadora até que o sobrenadante se tornou límpido. No último descarte, aproximadamente 1 ml do sobrenadante foi mantido no tubo e ressuspendido.

Duas a quatro gotas do material resultante foram dispostas em uma lâmina. Esta lâmina foi previamente lavada com álcool 70% e deixadas no congelador por alguns minutos, para formar uma camada de gelo e permitir que o material se espalhasse.

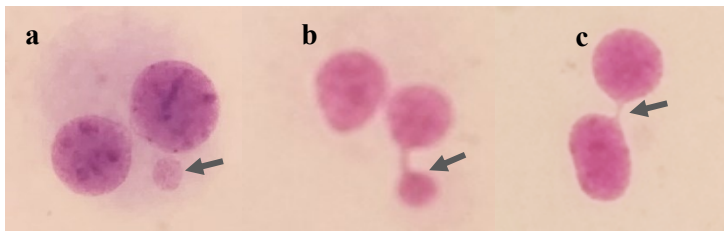
Foram confeccionadas duas lâminas por participante. Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de giemsa 10% por 8 minutos.

### 3.7.3 Leitura das lâminas

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico (ZEISS Axio Scope A1) no aumento de 200 vezes e para a confirmação das estruturas em 1000 vezes. As lâminas foram analisadas de maneira cega por um único observador e em duplicatas.

As frequências de MNs, NBUDs e NPNPs (Figura 3) foram contadas após a análise de 1000 linfócitos binucleados (500 células em cada lâmina por amostra). O IDN foi avaliado em 500 células (250 células em cada lâmina por amostra), que consiste na presença de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, apoptóticas e necróticas. O cálculo do IDN foi obtido pela fórmula  $IDN = (M1 + (2 * M2) + (3 * M3) + (4 * M4)) / N$ , onde M1 a M4 representa o número de células com 1 a 4 núcleos respectivamente, enquanto N é o número total de células viáveis (excluindo as células com necrose e apoptose).

Figura 4 – Células binucleadas com diferentes alterações contadas no teste CBMN.



Fonte: Elaborada pela autora

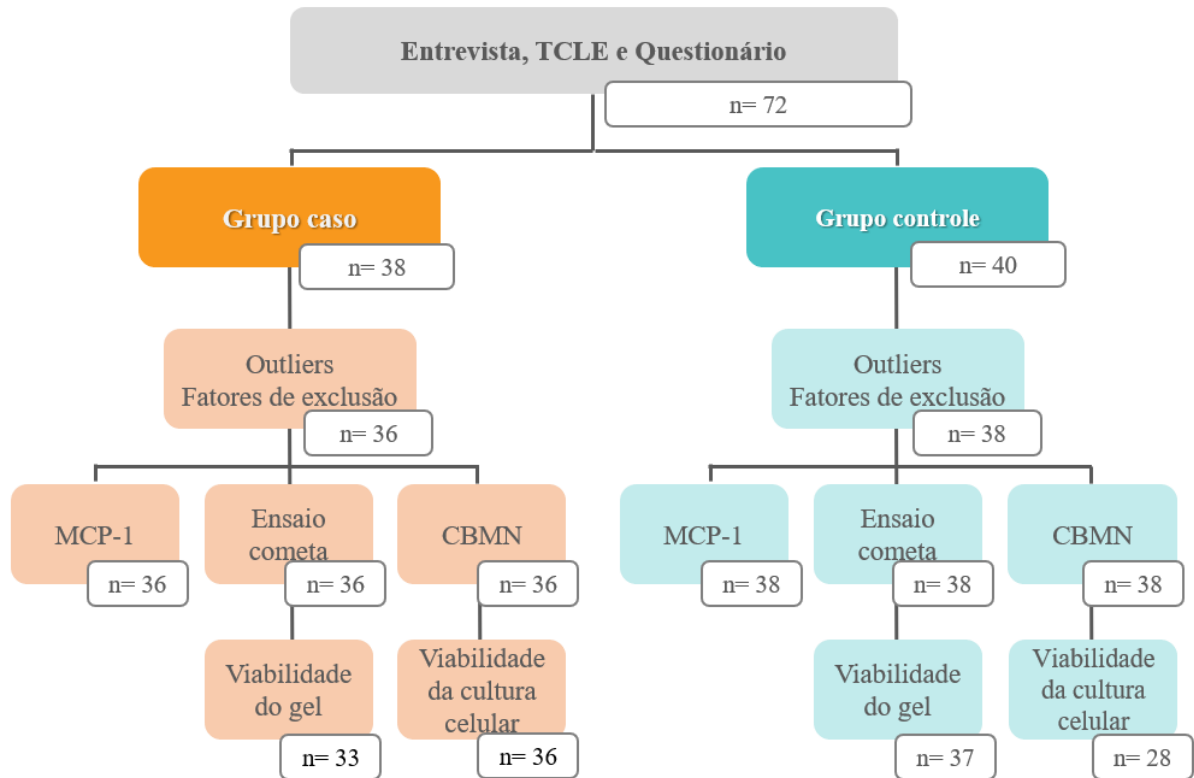
Legenda: Foto de microscopia eletrônica no aumento de 1000x. a: seta indica o micronúcleo (MN); b: seta indica *bud* nuclear (NBUD); c: seta indica ponte nucleoplasmática (NPNP).

### 3.8 FLUXOGRAMA

A figura 4 ilustra os processos deste estudo, que vão desde a entrevista e assinatura do TCLE até a realização das técnicas descritas na metodologia. O número amostral está identificado em cada uma das etapas, visto que ocorreram exclusões referentes a valores discrepantes na técnica de CBMN (1 indivíduo do grupo caso) e fatores de exclusão (2 indivíduos do grupo controle), estes foram excluídos de todo o estudo. Quanto ao ensaio cometa e o CBMN, quando houve perda do gel de agarose após eletroforese e o não crescimento da cultura celular, respectivamente, os valores foram omitidos apenas das técnicas que foram inviabilizadas.



Figura 5 – Fluxograma do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Este fluxograma ilustra o número amostral após a realização das técnicas descritas. n: número amostral final após a técnica realizada.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos foram analisados no software SPSS 20.0 da IBM. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. Para a comparação entre os grupos utilizou-se o teste mais apropriado de acordo com a distribuição da variável, sendo aplicado o teste *t* em variáveis com distribuição paramétrica e *U* de Mann Whitney nas variáveis não paramétricas. Para a comparação de três grupos ou mais, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado. Em relação as correlações, o teste de correlação de Spearman foi escolhido. A força da correlação foi classificada de acordo com o coeficiente de correlação, tendo como ponto de corte os seguintes valores de *r*: 0,0 | 0,25 fraca, 0,25 | 0,50 regular, 0,50 | 0,75 moderada e 0,75 | 1,0 forte. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Foram classificados como *outliers* os valores que ficaram acima de  $S = Q3 + 2,2 * IQR$  (limite superior) ou abaixo de  $I = Q1 - 2,2 * IQR$  (limite inferior). Os dados

quantitativos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana (mínimo – máximo), enquanto os qualitativos foram expressos como frequência absoluta ou relativa (%).

## 4 RESULTADOS

Nesta secção serão apresentados os resultados referentes ao perfil da população estudada, as concentrações séricas de MCP-1, marcadores de dano de DNA, alterações nucleares, índice mitótico e suas associações com a obesidade.

### 4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os dados coletados dos questionários referentes ao grupo dos indivíduos com obesidade (grupo caso) e o grupo de indivíduos saudáveis (grupo controle) estão descritos na Tabela 1. Observou-se que o sexo feminino foi predominante em ambos os grupos e que apresentaram semelhança entre idade, tabagismo e uso de suplementação vitamínica ( $p>0,05$ ). Quanto ao uso de vitaminas, 25% dos indivíduos com obesidade faziam uso de vitamina B12.

Também foi possível observar que mais indivíduos do grupo controle fazem atividade física ( $p=0,021$ ), porém, 27,8% do grupo com obesidade parou de fazer atividade física devido a problemas relacionados com a obesidade. Como esperado, o grupo com obesidade apresentou IMC maior que o grupo controle ( $p<0,001$ ). O grupo com obesidade apresentou mais mudanças de peso no último ano quando comparado ao grupo controle ( $p<0,001$ ), sendo que 30,6% tiveram aumento de peso e 44% diminuição, além disto, 27,8% dos indivíduos do grupo com obesidade, apresentavam obesidade desde a infância e/ou adolescência.

Tabela 1 – Caracterização da população estudada

	<b>Grupo caso (n: 36)</b>	<b>Grupo controle (n: 38)</b>	<b>p**</b>
<b>Sexo (feminino)</b>	80,6%	84,2%	0,680
<b>Idade (média ± DP*) (mínimo – máximo)</b>	43,7 ± 9,3 (29 – 62)	40,6 ± 10,0 (26 – 67)	0,107
<b>IMC (média ± DP*) (mínimo – máximo)</b>	49,30 ± 8,48 (34,1 – 70,6)	21,97 ± 2,16 (18,8 – 27,4)	<0,001
<b>Tabagismo</b>	0 % Tabagista 25,0 % Ex-tabagista	0 % Tabagista 13,2 % Ex-tabagista	0,194
<b>Suplementação com vitaminas*** (sim%)</b>	58,3 %	44,7 %	0,242
<b>Suplementação de B12# (sim%)</b>	25,0 %	0 %	0,001
<b>Atividade física (sim%)</b>	41,7 %	68,4 %	0,021
<b>Parou atividade física devido a comorbidades (sim%)</b>	27,8 %	_____	_____
<b>Mudança de peso no último ano</b>	30,6 % Ganho de peso 19,4 % Estável 44,4 % Perda de peso	5,3 % Ganho 73,7 % Estável 13,2 % Perda de peso	< 0,001
<b>Obesidade/sobrepeso na infância e/ou adolescência (sim%)</b>	27,8%	_____	_____

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Tabela com descrição do perfil dos participantes do estudo de acordo com o grupo (caso ou controle). Os valores estão representados como frequência relativa (porcentagem - %) ou mediana seguida dos valores mínimo e máximo. \*DP: Desvio padrão; (\*\*): o valor de *p* foi calculado mediante os testes estatísticos *qui-quadrado*, *U* de Mann-Whitney e teste *t* para amostras independentes; (\*\*\*): foi relatado o uso das seguintes suplementações: polivitamínicos, vitaminas do complexo B, vitamina D, Ferro, Cálcio, B12, Ômega 3, Colágeno, Folato, Vitamina C, Ácido fólico. (#): as outras vitaminas não foram analisadas devido à baixa frequência nos grupos.

#### 4.1.1 Comorbidades

Foi possível observar que 97,2% dos indivíduos do grupo com obesidade tem ao menos uma comorbidade, sendo que 75% tem Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), 63,9% Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), 41,7% dislipidemia, 30,6%, Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS), 19,4% esteatose e 58,3% depressão (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência das comorbidades associadas à obesidade no grupo caso.

	<b>Grupo caso (n: 36)</b>
<b>Presença de comorbidade(s) (sim%)</b>	97,2%
<b>Hipertensão arterial sistêmica (sim%)</b>	75,0%
<b>Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (sim%)</b>	63,9%
<b>Dislipidemia (sim%)</b>	41,7%
<b>Dores nas articulações (sim%)</b>	30,6%
<b>Apneia obstrutiva do sono (sim%)</b>	36,1%
<b>Esteatose (sim%)</b>	19,4%

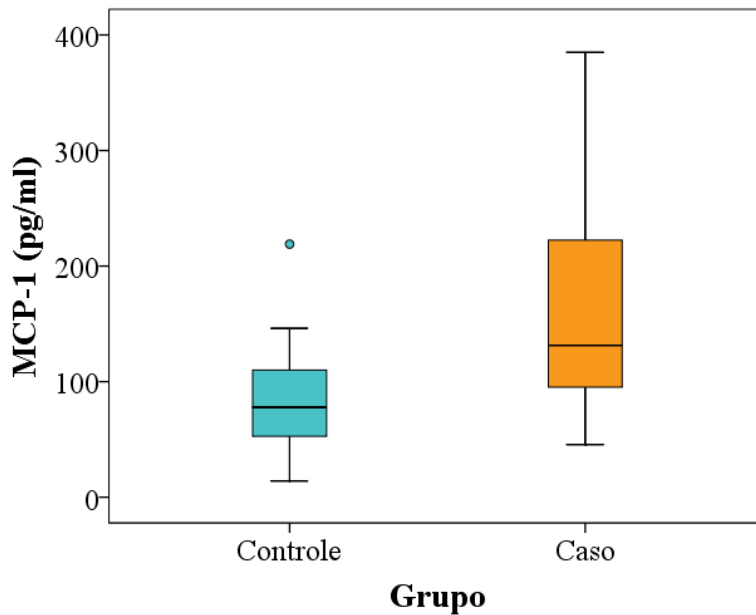
Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Tabela com descrição da frequência de comorbidades referidas no grupo caso. Os valores estão representados por frequência relativa em porcentagem ao número total dos indivíduos do grupo caso.

#### 4.2 PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS 1 (MCP-1)

Foi observado que a distribuição da concentração sérica de MCP-1 foi maior no grupo caso quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 5). Quando avaliado o grupo caso, não foi possível observar diferença estatística na distribuição da concentração de MCP-1 nos indivíduos com obesidade desde a infância/adolescência ( $p = 0,733$ ). A distribuição de MCP-1 foi a mesma no grupo controle referente a mudança de peso no último ( $p = 0,427$ ), entretanto, no grupo caso houve um aumento na concentração de MCP-1 no grupo que teve aumento de peso no último ano (Figura 6).

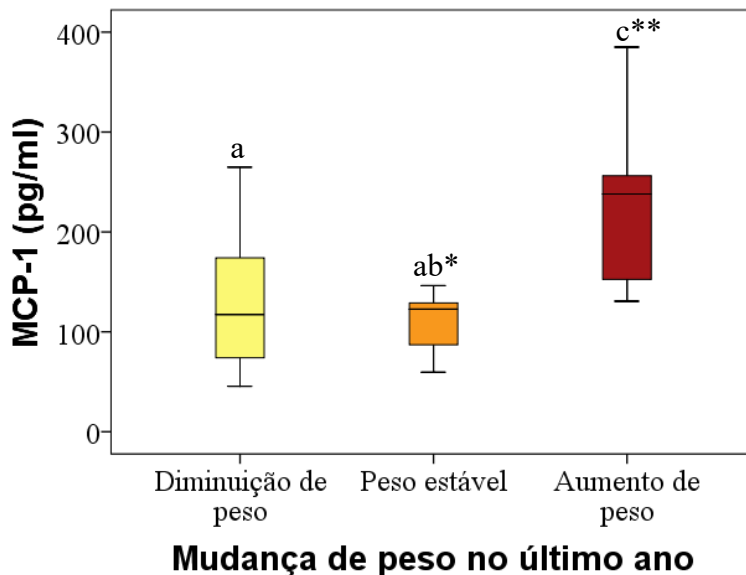
Figura 6 – Distribuição das concentrações séricas de MCP-1 nos grupos caso e controle.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes e whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. Teste *U* de Mann-Whitney  $p < 0,001$ . Grupo controle:  $n = 38$ ; grupo caso:  $n = 36$

Figura 7 – Aumento da distribuição de MCP-1 nos indivíduos do grupo caso em relação à variação de peso no último ano.



Fonte: Elaborada pela autora.

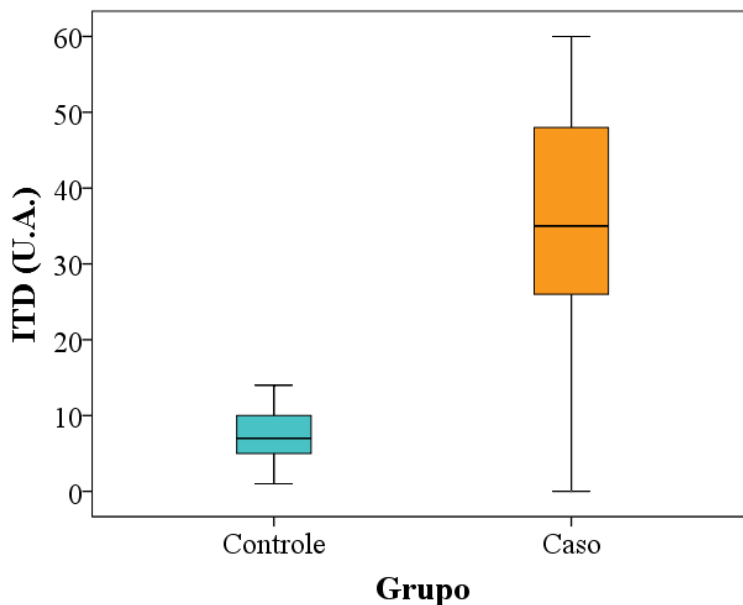
Legenda: As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes e whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. Teste de Kruskal-Wallis  $*p = 0,001$ ;  $**p = 0,005$ . Grupo caso:  $n = 34$ , dois participantes não souberam informar a mudança de peso no último ano.

### 4.3 MARCADORES DE DANO DE DNA

#### 4.3.1 Ensaio Cometa

Para o ensaio cometa foram analisadas lâminas de 33 indivíduos do grupo caso e 37 do grupo controle. A média do ITD do ensaio cometa foi maior no grupo caso quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 7). Não houve diferença entre ITD e o uso de suplementação vitamínica ( $p = 0,245$  no grupo controle e  $p = 0,374$  no grupo caso), uso de vitamina B12 ( $p = 0,368$  no grupo caso), prática de atividade física ( $p = 0,155$  no grupo controle e  $p = 0,446$  no grupo caso), mudança de peso ( $p = 0,491$  no grupo controle e  $p = 0,814$  no grupo caso) e tabagismo em ambos os grupos ( $p = 0,079$  no grupo controle e  $p = 0,328$  no grupo caso). Quando observado o grupo caso, não houve diferença estatística na média de ITD entre os grupos com e sem obesidade na infância/adolescência ( $p = 0,226$ ).

Figura 8 – Índice de dano total do ensaio cometa nos grupos caso e controle.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os valores de ITD estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes e whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. ITD: Índice de Dano Total. Teste *t* para variáveis independentes  $p < 0,001$ . Grupo controle:  $n = 37$ ; grupo caso:  $n = 33$ .

#### 4.3.2 Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular

A frequência de MN no grupo caso apresentou-se aumentada em relação ao grupo controle ( $p = 0,007$ ), bem como a frequência de NBUD ( $p < 0,001$ ) e NPNP ( $p = 0,001$ ), enquanto

a distribuição do IDN estava diminuída com  $p < 0,001$ . Não houve diferença estatística da frequência de apoptose entre os grupos, entretanto, o grupo caso apresentou uma distribuição maior da frequência de células com necrose (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados da técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular

	<b>Grupo caso (n: 36)</b>	<b>Grupo controle (n: 28)</b>	<b><math>p^{**}</math></b>
<b>MN (média ± DP*)</b>	18,7 ± 9,1	13,43 ± 5,9	0,007
<b>NBUD (média ± DP*)</b>	18,5 ± 10,5	6,9 ± 4,0	<0,001
<b>NPNP (mínimo – máximo)</b>	6,5 (0 – 29)	3 (0 – 9)	0,001
<b>IDN (mínimo – máximo)</b>	1,4 (1,2 – 1,7)	1,6 (1,3 – 1,8)	<0,001
<b>Apoptose (mínimo – máximo)</b>	2,03 (0 – 9)	1,0 (0 – 5)	0,621
<b>Necrose (mínimo – máximo)</b>	4,0 (0 – 13)	1,0 (0 – 7)	0,028

Fonte: Elaborada pela autora.

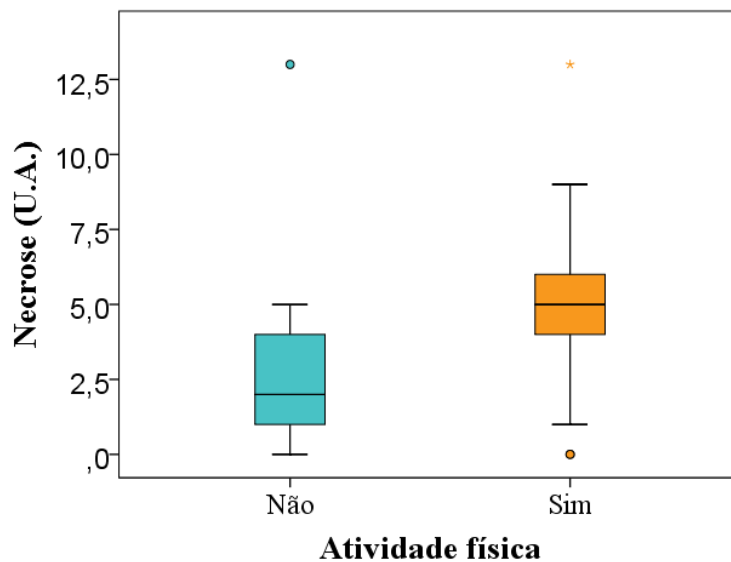
Legenda: Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias. Os valores estão representados como média ± DP ou mediana seguida dos valores mínimo e máximo. IMC: índice de massa corporal; MN: micronúcleos; NBUD: *buds* nucleares; NPNP: pontes nucleoplasmáticas; IDN: índice de divisão nuclear; \*DP: desvio padrão; (\*\*): o valor de  $p$  foi calculado mediante os testes  $U$  de Mann-Withney e teste  $t$  para amostras independentes, de acordo com a distribuição da variável.

Quando avaliado o grupo controle não foi encontrada diferença estatística entre as frequências citadas acima e a mudança de peso no último ano ( $p=0,556$  para MN,  $p=0,386$  para NBUD,  $p=0,872$  para NPNP,  $p=0,595$  para IDN,  $p=0,205$  para apoptose,  $p=0,432$  para necrose), atividade física ( $p= 0,261$  para MN,  $p= 0,391$  para NBUD,  $p=0,653$  para NPNP,  $p=0,602$  para IDN,  $p=0,287$  para apoptose,  $p=0,196$  para necrose), suplementação vitamínica ( $p=0,780$  para MN,  $p=0, 096$  para NBUD,  $p=0,224$  para NPNP,  $p=0,433$  para IDN,  $p= 0,726$  para apoptose,  $p= 0,351$  para necrose), e o tabagismo ( $p= 0,460$  para MN,  $p= 0,506$  para NBUD,  $p=0,524$  para NPNP,  $p=0,433$  para IDN,  $p=0,726$  para apoptose,  $p=0,351$  para necrose). Quanto ao grupo caso não houve diferença quanto mudança de peso no último ano ( $p=0,988$  para MN,  $p=0,993$  para NBUD,  $p=0,319$  para NPNP,  $p=0,313$  para IDN,  $p= 0,765$  para apoptose,  $p= 0,303$  para necrose), suplementação vitamínica ( $p=0,584$  para MN,  $p=0,226$  para NBUD,  $p=0,205$  para



NPNP,  $p=0,086$  para IDN,  $p= 0,312$  para apoptose,  $p= 1,000$  para necrose), suplementação com vitamina B12 ( $p=0,105$  para MN,  $p=0,403$  para NBUD,  $p=0,180$  para NPNP,  $p=0,086$  para IDN,  $p=0,541$  para apoptose,  $p=0,450$  para necrose) e o tabagismo ( $p=0,443$  para MN,  $p=0,560$  para NBUD,  $p=0,205$  para NPNP,  $p=0,595$  para IDN,  $p= 0,312$  para apoptose,  $p= 1,000$  para necrose), aos que desenvolveram obesidade na infância/adolescência e os que desenvolveram na vida adulta ( $p=0,616$  para MN,  $p=0,858$  para NBUD,  $p=0,653$  para NPNP,  $p=0,602$  para IDN,  $p=0,287$  para apoptose,  $p=0,196$  para necrose), entretanto o grupo que realiza atividade física apresentou uma distribuição na frequência de células necróticas maior do que o grupo que não ( $p=0,001$ ) (Figura 8).

Figura 9 – Frequência de células em necrose no grupo caso, de acordo com a realização de atividade física.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes e whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. U.A.: Unidades Arbitrárias. Teste  $U$  de Mann-Whitney  $p=0,011$ . Grupo que realiza não atividade física:  $n= 21$ ; grupo que realiza atividade física:  $n= 15$ .

#### 4.4 CORRELAÇÕES

Os dados quantitativos foram correlacionados utilizando o teste de correlação de Spearman. De acordo com o que está demonstrado na Tabela 4, foi observado correlação positiva entre IMC, ITD, NBUD, NPNP e MCP-1 e negativa entre IMC e IDN. A idade apresentou correlação positiva com MN.

Em relação ao ITD, foi constatada correlação negativa com IDN e positiva com MN, NBUD, NPNP, frequência de células em apoptose e MCP-1, o IDN está correlacionado negativamente com NBUD, NPNP e MCP-1. A frequência de MN está positivamente correlacionada com a frequência de células em apoptose, enquanto a frequência de NBUD está positivamente correlacionada com NPNP e MCP-1 e houve uma correlação positiva entre NPNP e MCP-1. No que se refere a frequência de células em apoptose, houve uma correlação positiva com a frequência de células em necrose.

As figuras 10, 11, 12 e 13 representam a dispersão dos valores nas correlações entre MCP-1 e IMC, ITD, IDN e NBUD respectivamente.

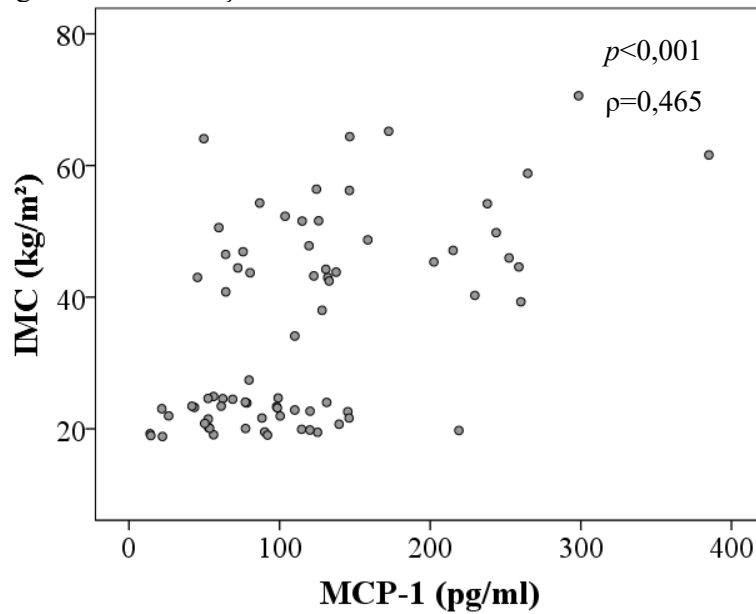
Tabela 4 – Correlações entre parâmetros quantitativos considerando todos os participantes do estudo

	<b>IMC</b>	<b>ID</b>	<b>ITD</b>	<b>IDN</b>	<b>MN</b>	<b>NBUD</b>	<b>NPNP</b>	<b>APO</b>	<b>NEC</b>	<b>MCP-1</b>
<b>IMC</b>	---	$\rho:$ 0,184	$\rho:$ 0,642**	$\rho:$ -0,429**	$\rho:$ 0,212	$\rho:$ 0,540**	$\rho:$ 0,400**	$\rho:$ 0,002	$\rho:$ 0,141	$\rho:$ 0,465**
<b>ID</b>		---	$\rho:$ 0,174	$\rho:$ 0,053	$\rho:$ 0,278*	$\rho:$ 0,051	$\rho:$ 0,112	$\rho:$ 0,113	$\rho:$ -0,015	$\rho:$ 0,178
<b>ITD</b>			---	$\rho:$ -0,476**	$\rho:$ 0,336**	$\rho:$ 0,555**	$\rho:$ 0,320*	$\rho:$ 0,132	$\rho:$ 0,293*	$\rho:$ 0,327**
<b>IDN</b>				---	$\rho:$ 0,099	$\rho:$ -0,487**	$\rho:$ -0,309*	$\rho:$ 0,078	$\rho:$ -0,228	$\rho:$ -0,394**
<b>MN</b>					---	$\rho:$ 0,207	$\rho:$ 0,182	$\rho:$ 0,285*	$\rho:$ 0,178	$\rho:$ -0,048
<b>NBUD</b>						---	$\rho:$ 0,616**	$\rho:$ 0,048	$\rho:$ 0,123	$\rho:$ 0,338**
<b>NPNP</b>							---	$\rho:$ 0,052	$\rho:$ 0,039	$\rho:$ 0,303*
<b>Apoptose</b>								---	$\rho:$ 0,543*	$\rho:$ -0,202
<b>Necrose</b>									---	$\rho:$ 0,025
<b>MCP-1</b>										---

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: IMC: índice de massa corporal; ID: idade; ITD: índice total de dano (ensaio cometa); IDN: índice de divisão nuclear; MN: micronúcleo; NBUD: *bud* nuclear; NPNP: ponte nucleoplasmática; APO: células em apoptose; NEC: células em necrose; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1;  $\rho$ : coeficiente de correlação de Spearman (\*\*): a correlação é significativa no nível  $p \leq 0,01$ ; (\*): a correlação é significativa no nível  $P \leq 0,05$ .

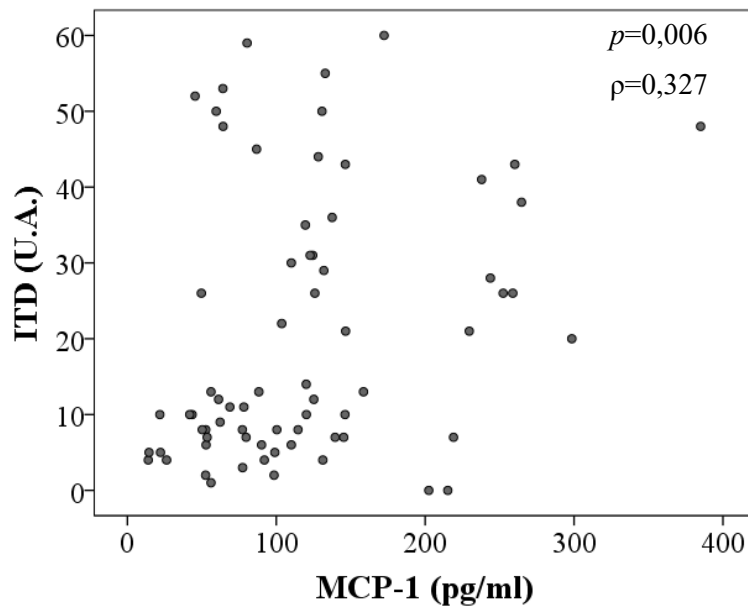
Figura 10 – Correlação entre MCP-1 e IMC considerando todos os participantes do estudo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão. IMC: índice de massa corporal; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1;  $\rho$ : teste de correlação de Spearman

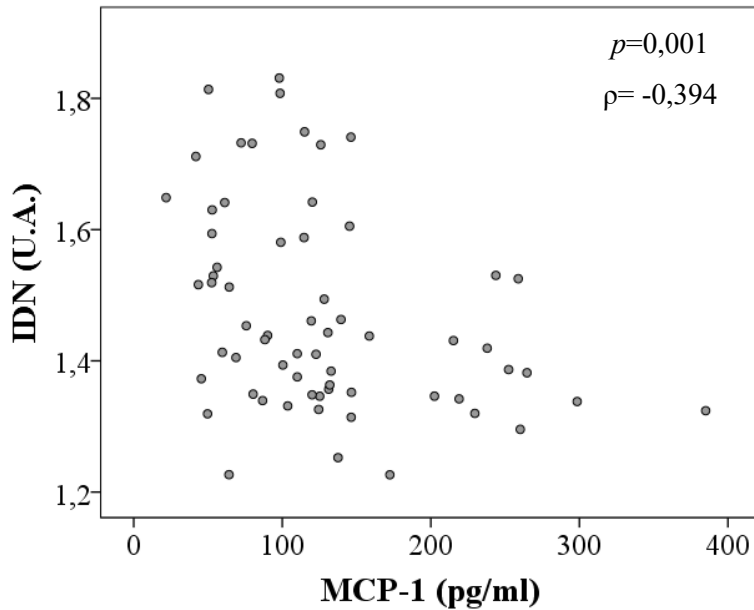
Figura 11 – Correlação entre MCP-1 e ITD considerando todos os participantes do estudo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão. ITD: índice total de dano; U.A.: unidades arbitrárias; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1;  $\rho$ : teste de correlação de Spearman

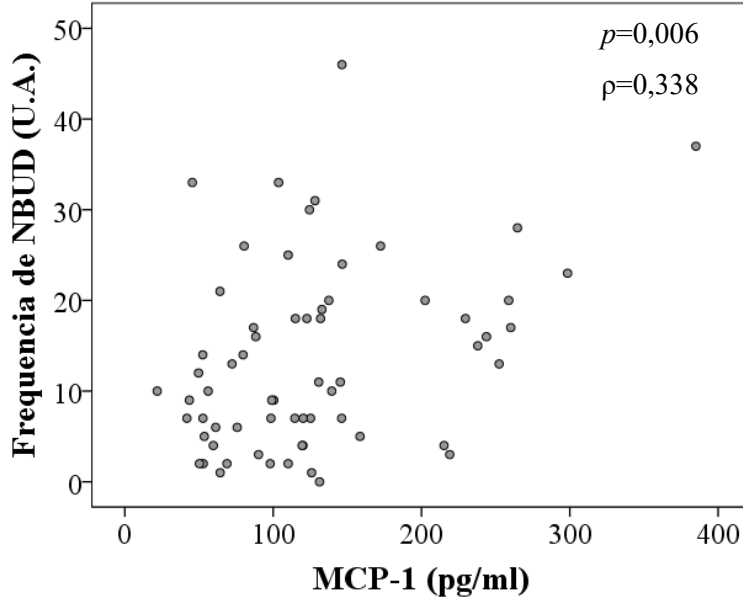
Figura 12 – Correlação entre MCP-1 e IDN considerando todos os participantes do estudo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão. IDN: índice de divisão nuclear; U.A.: unidades arbitrárias; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1;  $\rho$ : teste de correlação de Spearman

Figura 13 – Correlação entre MCP-1 e NBUD considerando todos os participantes do estudo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão. NBUD: *buds* nucleares; U.A.: unidades arbitrárias; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1;  $\rho$ : teste de correlação de Spearman

## 5 DISCUSSÃO

Apesar da obesidade acometer ambos os sexos, foi observado neste estudo que há uma predominância do sexo feminino na realização da cirurgia bariátrica. Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM) mais de 70% dos pacientes são mulheres, o que pode ser explicado por haver uma maior preocupação e cuidado com a saúde, além da pressão para perder peso ser maior para mulheres (FARINHOLT et al., 2013; OMS, 2019; WHO, 2018).

A MCP-1 é uma quimiocina secretada principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas. A secreção de MCP-1 no tecido adiposo resulta no aumento da inflamação, resultante da infiltração de macrófagos, sendo esperado aumentada na obesidade. A expressão de MCP-1 está aumentada no tecido adiposo branco (TAB) em camundongos com obesidade induzida por dieta (AMANO et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2003) e em humanos a expressão de MCP-1 é maior em indivíduos com obesidade (SARTIPY; LOSKUTOFF, 2003). Sendo que a expressão do mRNA de MCP-1 está correlacionado positivamente com MCP-1 circulante e o IMC (CHRISTIANSEN; RICHELSEN; BRUUN, 2005; HALBERG; WERNSTEDT-ASTERHOLM; SCHERER, 2008). Estes dados corroboram ao aumento da concentração de MCP-1 no grupo com obesidade, além de estar aumentada nos indivíduos do grupo caso que tiveram aumento de peso e correlacionada positivamente com o IMC. O aumento de MCP-1 confirma a inflamação com infiltração de macrófagos que ocorre na obesidade.

O DNA está constantemente exposto a danos, sendo que o sistema de reparo de DNA é capaz de reparar a maior parte. Os danos não reparados com o tempo levam ao acúmulo de mutações (LINDAHL; BARNES, 2000). Foi encontrada correlação positiva entre ITD e todos os marcadores de dano genético, após a ação do sistema de reparo, avaliado a partir da técnica de CBMN (MN, NBUD, NPNP), demonstrando que quando há muito dano de DNA, algumas mutações escapam do reparo, gerando dano permanente, podendo resultar no acúmulo de mutações consequentemente. Além disto, houve correlação entre ITD e necrose, demonstrando que o aumento da frequência de lesões no DNA pode levar a morte celular. A probabilidade de acúmulo de instabilidade genômica aumenta de acordo com a idade celular (AUNAN et al., 2016). Neste trabalho foi encontrada uma correlação positiva entre a idade e a frequência de MN, de acordo com diversos autores que relataram o aumento da frequência de MN com a idade (BOLOGNESI et al., 1997; FENECH; BONASSI, 2011).

O estudo de Nishimoto e colaboradores (2016) demonstrou um aumento na frequência de SSBs e DSBs em camundongos com obesidade induzida por dieta, sendo que a dieta rica em gordura aumentou a frequência de SSBs, sendo associada com o aumento do tecido adiposo

visceral. Quando analisaram a concentração plasmática em humanos, a frequência de SSBs apresentou-se aumentada nos pacientes com obesidade visceral, com uma correlação positiva com a área de gordura visceral (analisada por tomografia computadorizada). O ensaio cometa quantifica lesões de DNA passíveis de reparo decorrentes de quebras ssDNA e dsDNA, formação de sítios álcali lábeis e *Cross-links* DNA-DNA e DNA-proteína (BURLINSON et al., 2007). Estudos demonstraram um aumento do ITD em indivíduos com obesidade (KARAMAN et al., 2015; WŁODARCZYK et al., 2018; WŁODARCZYK; NOWICKA, 2019) e que há uma diminuição após a perda de peso mediada por cirurgia bariátrica (BANKOGLU et al., 2018a, 2018b). Neste estudo, o grupo com obesidade apresentou uma frequência maior de ITD do que o grupo sem obesidade, além de uma correlação positiva entre ITD e IMC, demonstrando que há um aumento no dano de DNA antes do mecanismo de reparo na obesidade.

O estudo de Scarpato e colaboradores (2011) demonstrou um aumento na frequência de MN em crianças com sobrepeso e obesidade. Em 2014, Donmez-Altunas e colaboradores relataram um aumento nas frequências de MN, NBUD e NPNP analisadas a partir da técnica de CBMN. Corroborando os achados da literatura, neste estudo as frequências de MN, NBUD e NPNP, apresentaram valores aumentados no grupo com obesidade, demonstrando que o dano de DNA não foi reparado, podendo levar a um acúmulo de mutações e ao desenvolvimento de câncer em indivíduos com obesidade. Além disto, NBUD e NPNP estão positivamente correlacionados com o IMC, demonstrando que houve eliminação de DNA amplificado e o reparo errôneo do DNA, respectivamente.

O acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos levam a hipertrofia e conseqüentemente induzem disfunção mitocondrial, aumentando a produção de EROs e citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento da inflamação crônica presente na obesidade, sendo que a inflamação e a produção de EROs podem causar dano de DNA (AL-AUBAIDY; JELINEK, 2011; MANNA; JAIN, 2015). Neste estudo, foi possível observar uma correlação positiva entre as concentrações de MCP-1 e ITD, dando suporte de que a inflamação associada a obesidade pode levar ao dano de DNA. Sendo que as correlações positivas entre MCP-1, NBUD e NPNP foram estatisticamente significantes, demonstrando que o dano de DNA não foi reparado.

Apoptose e necrose são marcadores de citotoxicidade, visto que a morte celular é um mecanismo de escolha quando as lesões no DNA não podem ser reparadas. Neste estudo não foi encontrada diferença na frequência de células com apoptose entre os grupos, porém houve

uma correlação positiva entre a frequência de MN, demonstrando uma remoção das células com lesão. Nos casos de obesidade grau III, há necrose dos adipócitos, formando estruturas em forma de coroa (NISHIMURA et al., 2007). Neste estudo a frequência de células em necrose apresentou-se aumentada no grupo com obesidade. Os adipócitos em hipóxia secretam quimiocinas para recrutar macrófagos para limpar células necróticas, enquanto a expressão do receptor de MCP-1 apresentou-se aumentada em macrófagos com estrutura de coroa (LUMENG et al., 2007). Porém, não foi encontrada correlação entre a frequência de células em necrose com MCP-1. No grupo com obesidade, os indivíduos que realizavam atividade física apresentaram frequências de células em necrose maiores, isto pode ser explicado devido a formação de EROs e aumento da inflamação durante a prática de exercício físico, que exacerbaria os processos inflamatórios e de morte celular

O IDN é biomarcador citostático que fornece uma resposta mitogênica, visto que as células com lesão podem ser levadas a morte celular, inviabilizando a divisão e aumentando a frequência de apoptose e/ou necrose (FENECH, 2007; FENECH et al., 2003). O que corrobora os achados deste estudo, pois ficou evidenciada uma correlação negativa entre IDN e frequência de células em necrose, demonstrando que quanto maior a morte celular por necrose, menor o IDN. Além disto, neste estudo o grupo com obesidade apresentou IDN menor que o grupo controle e houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre IDN e IMC, NBUD, NPNP e MCP-1. O estudo de Donmez-Altunas e colaboradores (2014) demonstrou resultados semelhantes, nos quais houve correlação negativa entre IDN, células em necrose e IMC, além de uma diminuição em IDN no grupo com sobrepeso.



## 6 CONCLUSÃO

Os indivíduos com obesidade apresentaram maiores frequências de dano de DNA antes e após o mecanismo de reparo do DNA quando comparadas às frequências do grupo controle. Sendo que não foi encontrada associação entre o uso de suplementação vitamínica e o reparo das lesões, incluindo o uso da vitamina B12 por indivíduos com obesidade. Além disso, este estudo demonstrou que a prática de exercícios físicos aumenta a frequência de células com necrose no grupo com obesidade.

A variável idade apresentou uma correlação positiva com a frequência de MN, porém todos os outros marcadores de dano de DNA não apresentaram correlação com a idade. Quanto ao IMC, houve correlação entre ITD, NBUD, NPNP e MCP-1, demonstrando que nos indivíduos deste estudo o peso pode estar associado ao aumento das lesões de DNA antes e após o mecanismo de reparo, além da morte celular exacerbada. Outro achado importante foi a correlação negativa entre IDN e IMC, evidenciando alterações na divisão celular dos pacientes.

O processo inflamatório que ocorre na obesidade, aumenta os macrófagos no tecido adiposo e isto pode estar sendo extrapolado para a circulação, visto que a concentração sérica de MCP-1 demonstrou estar aumentada nos indivíduos com obesidade e correlacionada com o IMC. O processo inflamatório exacerbado na obesidade pode estar contribuindo para gerar lesões de DNA antes e após os mecanismos de reparo, o que pode estar correlacionado com o aumento do risco de os indivíduos com obesidade desenvolverem câncer.

## REFERÊNCIAS

ABESO. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade.**

AL-AUBAIDY, H. A.; JELINEK, H. F. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Endocrinology**, v. 164, n. 6, p. 899–904, 2011.

AMANO, S. U. et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 162–171, 2014.

AUNAN, J. R. et al. Molecular and biological hallmarks of ageing. **British Journal of Surgery**, v. 103, n. 2, p. e29–e46, 2016.

AZQUETA, A. et al. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 781, n. March, p. 71–87, 2019.

AZZARÀ, A. et al. Different repair kinetic of DSBs induced by mitomycin C in peripheral lymphocytes of obese and normal weight adolescents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 789, p. 9–14, 2016.

BANKOGLU, E. E. et al. Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6–13, 2018a.

BANKOGLU, E. E. et al. Reduction of DNA damage in peripheral lymphocytes of obese patients after bariatric surgery-mediated weight loss. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 61–67, 2018b.

BHUPATHIRAJU, S. N.; HU, F. B. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1723–1735, 2016.

BOLOGNESI, C. et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 6, n. 4, p. 249–256, 1997.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 31–35, 2007.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579–591, 2004.

CATALÁN, V. et al. Proinflammatory cytokines in obesity: Impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. **Obesity Surgery**, v. 17, n. 11, p. 1464–1474, 2007.

CEJVANOVIC, V. et al. Markers of oxidative stress in obese men with and without hypertension. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 76, n. 8, p. 620–625, 2016.

CERDÁ, C. et al. Oxidative stress and DNA damage in Obesity-Related Tumorigenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 824, p. 5-17, 2014.

CHRISTIANSEN, T.; RICHELSEN, B.; BRUUN, J. M. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 1, p. 146–150, 2005.

CORNIER, M. A. et al. Prevention of overweight/obesity as a strategy to optimize cardiovascular health. **Circulation**, v. 124, n. 7, p. 840–850, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.

DESAULNIERS, D. et al. Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36, p. S61–S88, 2015.

DI CESARE, M. et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

DONMEZ-ALTUNTAS, H. et al. Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 771, p. 30–36, 2014.

FARINHOLT, G. N. et al. A call to arms: Obese men with more severe comorbid disease and underutilization of bariatric operations. **Surgical Endoscopy**, v. 27, n. 12, p. 4556–4563, 2013.

FENECH, M. et al. Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, 2007.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 12–25, 2016.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 43–49, 2011.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 161, n. 2, p. 193–198, 1986.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117–3132, 2011.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. et al. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 8, p. 1032–1039, 2012.

FRIEDBERG, E. C. A brief history of the DNA repair field. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 3–7, 2008.

FUJISAKA, S. et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2574–2582, 2009.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature reviews disease primers**, v. 170, n. 5, p. ITC33–ITC48, 2017.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01–GE05, 2015.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P. E. The Adipocyte as an Endocrine Cell. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 753–768, 2008.

HAN, C. Y. et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 10379–10393, 2012.

HARMAN-BOEHM, I. et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 6, p. 2240–2247, 2007.

HOTAMISLIGIL, GÖKHAN S.; SHARGIL, NARINDER S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HU, C. et al. Central obesity transition increased urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in male adults: A 3-year follow up study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 91, p. 53–60, 2019.

HUH, J. Y. et al. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipocyte dysfunction in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 4, p. 890–896, 2017.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2373–2380, 2007.

KARAMAN, A. et al. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 782, p. 30–35, 2015.

KERN, PHILIP A; et al. The Expression of Tumor Necrosis in Human Adipose Tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2111–2119, 1995.

- KIDANE, D. et al. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 2, p. 116–139, 2014.
- KIM, C. S. et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. **International Journal of Obesity**, v. 30, n. 9, p. 1347–1355, 2006.
- KUMARI, S. et al. DNA damage: detection strategies. **Excli Journal**, v. 7, p. 44–62, 2008.
- KYRGIUO, M. et al. Adiposity and cancer at major anatomical sites: Umbrella review of the literature. **BMJ (Online)**, v. 356, p. 1–10, 2017.
- LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15–20, 2016.
- LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 65, p. 127–133, 2000.
- LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.
- MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423–444, 2015.
- MARTA, W.; MICHAŁ, C.; GRAŻYNA, N. TNF- $\alpha$  G-308A genetic variants, serum CRP-hs concentration and DNA damage in obese women. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 855–866, 2019.
- MATIA-GARCÍA, I. et al. A possible association between the 2515 A>G MCP-1 polymorphism and insulin resistance in school children. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 72–79, 2018.
- MAZZARELLA, L. Why does obesity promote cancer? Epidemiology, biology, and open questions. **Ecancermedicalsecience**, v. 9, p. 1–18, 2015.
- MCALLISTER, E. J. et al. Ten putative contributors to the obesity epidemic. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 10, p. 868–913, 2009.
- MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 367–378, 2014.
- NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183–1186, 2001.

NISHIMOTO, S. et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Science Advances**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2016.

NISHIMURA, S. et al. Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay. **Diabetes**, v. 56, n. June, p. 1517–1526, 2007.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 23–29, 2006.

POITOU, C. et al. Role of serum amyloid A in adipocyte-macrophage cross talk and adipocyte cholesterol efflux. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1810–1817, 2009.

PORTER STARR, K. N. et al. Influence of Weight Reduction and Enhanced Protein Intake on Biomarkers of Inflammation in Older Adults with Obesity. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, v. 38, n. 1, p. 33–49, 2019.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, 2017.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 7265–7270, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**. 2018.

SCARPATO, R. et al. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the  $\gamma$ -H2AX focus assay and micronucleus test. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 685–693, 2011.

SELVARAJU, V. et al. Urinary Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress Are Elevated in Obese Children and Correlate with a Marker of Endothelial Dysfunction. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SJÖHOLM, K. et al. Association of serum amyloid A levels with adipocyte size and serum levels of adipokines: Differences between men and women. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 260–266, 2009.

TAKAHASHI, K. et al. Adiposity Elevates Plasma MCP-1 Levels Leading to the Increased CD11b-positive Monocytes in Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46654–46660, 2003.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 112–122, 2000.

TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 644–656, 2017.

TYSON, J. et al. Inter-individual variation in nucleotide excision repair in young adults: Effects of age, adiposity, micronutrient supplementation and genotype. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 9, p. 1316–1323, 2009.

URDAMPILLETA, A. et al. Usefulness of combining intermittent hypoxia and physical exercise in the treatment of obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, 2012.

USMAN, M.; VOLPI, E. V. DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 778, p. 23–37, 2018.

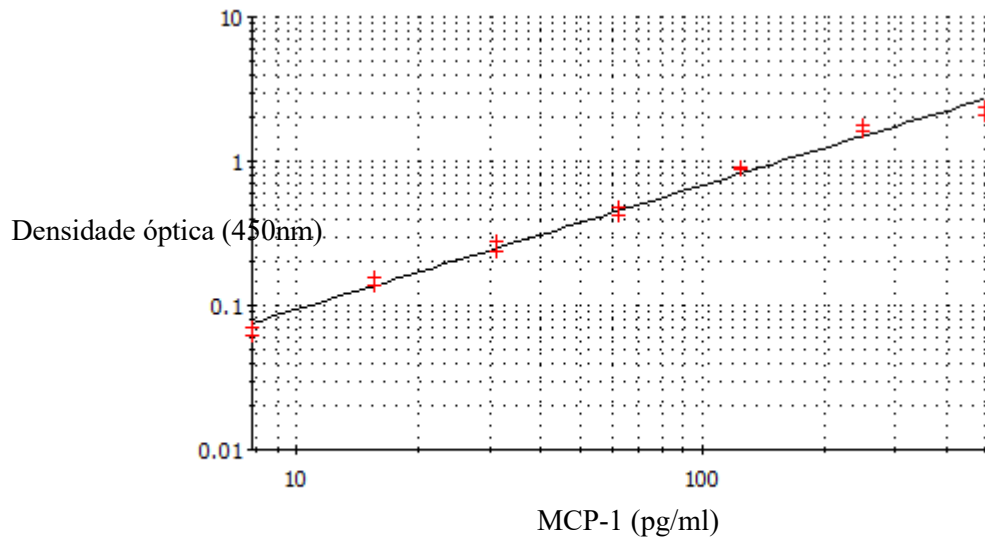
WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>.

WŁODARCZYK, M. et al. Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 1–12, 2018.

WŁODARCZYK, M.; NOWICKA, G. Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1146, 2019.

**APÊNDICE A – Curva de calibração MCP-1**

Figura 1 – Curva de calibração MCP-1



Fonte: Elaborada pela autora.



## ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos níveis de estresse oxidativo e de dano de DNA em indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica.

**Pesquisador:** Sharbel Weidner Maluf

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 83011617.9.0000.0121

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.595.398

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de mestrado de Natali Silva Cardoso sob orientação de Sharbel Weidner Maluf, do Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Estudo prospectivo transversal, com 120 participantes. Critérios de inclusão: serão selecionados pacientes da equipe de cirurgia bariátrica do Hospital Universitário da UFSC que tenham assinado o TCLE sendo excluídos os que tenham histórico anterior de neoplasias. Critérios de exclusão: Não constam. Intervenções: será coletado 8 ml de sangue periférico para os ensaios de dano de DNA. As informações clínicas serão obtidas a partir de um questionário adaptado do "Questionário de Saúde Pessoal", os dados clínicos serão colhidos nos prontuários.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Avaliar os níveis de dano de DNA e estresse oxidativo em linfócitos de indivíduos com obesidade mórbida. **Objetivo Secundário:** a) Avaliar as frequências de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos (buds) nucleares, células apoptóticas, células necróticas e o índice mitótico através da técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese celular em indivíduos com obesidade mórbida e controles. b) Avaliar os níveis de dano de DNA através da técnica do cometa em indivíduos com obesidade mórbida e controles. c) Avaliar os níveis de estresse oxidativo, através das técnicas de TBARS, da Catalase (Cat), da Superóxido

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.595.398

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1024759.pdf	27/03/2018 09:47:22		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Natali.pdf	26/03/2018 22:14:47	Natali Silva Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Natali.pdf	26/03/2018 21:53:31	Natali Silva Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Natali.pdf	26/03/2018 21:52:41	Natali Silva Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Natali.pdf	01/02/2018 19:46:56	Natali Silva Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura_Natali.pdf	01/02/2018 19:45:40	Natali Silva Cardoso	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 12 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**Luiz Eduardo Toledo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (sangue periférico):

**Projeto:** Avaliação dos níveis de estresse oxidativo e de dano de DNA em indivíduos encaminhados para cirurgia bariátrica

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que consiste na avaliação das alterações encontradas no sangue de pessoas com obesidade. Esta pesquisa está associada ao projeto de mestrado de Natali Silva Cardoso, do programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. A realização deste estudo permitirá entender melhor a correlação entre a obesidade, o estresse oxidativo e possíveis danos de DNA.

Se você aceitar, serão colhidas duas amostras de sangue de 4 ml e será aplicado um questionário. Na coleta de sangue você pode sentir algum desconforto e em alguns casos pode ocorrer a formação de um hematoma no local da punção. Durante os procedimentos de coleta de sangue e de dados você estará sempre acompanhado por um dos pesquisadores, que lhe prestará toda a assistência necessária ou acionará pessoal competente para isso.

Caso tenha alguma dúvida sobre os procedimentos ou sobre o projeto você poderá entrar em contato com o pesquisador a qualquer momento pelo telefone ou e-mail abaixo. Sinta-se absolutamente à vontade em não participar ou deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem ter que apresentar qualquer justificativa. Se decidir deixar de participar da pesquisa você não terá qualquer prejuízo no atendimento médico-laboratorial.

Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, onde serão mostrados apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação na pesquisa. Você não terá nenhuma despesa advinda de sua participação nesta pesquisa, já que a coleta de amostra e aplicação do questionário serão realizadas neste momento, sem custo algum. Com relação aos exames realizados, os resultados serão entregues a você pela pesquisadora principal que fará a orientação sobre os hábitos que favorecem a melhora dos indicadores de estresse oxidativo e melhora da qualidade de vida. Sua participação na pesquisa ajudará a compreender alguns fatores envolvidos nas malformações fetais, contribuindo para um melhor entendimento das alterações que ocorrem no organismo relacionadas às malformações.

Dois vias deste documento estão sendo rubricadas e assinadas por você e pelo pesquisador responsável. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_, li este documento (ou tive este documento lido para mim por uma pessoa de confiança) e obtive dos pesquisadores todas as informações que julguei necessárias para me sentir esclarecido e optar por livre e espontânea vontade participar da pesquisa.

O pesquisador responsável, que também assina esse documento, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa. Você poderá entrar em contato com o pesquisador Prof. Sharbel Weidner Maluf, pelo telefone 3721-8081 (Laboratório de Análises Clínicas do HU UFSC), e-mail s.maluf@ufsc.br. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC pelo telefone (48) 3721-6094, e-mail cep.propesq@contato.ufsc.br ou pessoalmente na rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Principal Natali Silva Cardoso

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável Sharbel Weidner Maluf

**ANEXO C –Questionário aplicado no grupo caso**  
**QUESTIONÁRIO GRUPO CASO**

Data da entrevista:

Entrevistador(a):

**Identificação, hábitos e fatores socioeconômicos:**

- 1) Nome Completo:
- 2) Número do prontuário:
- 3) Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_
- 4) Sexo: (M) (F)
- 5) Estado Civil: ( ) Casado ou União Estável ( ) Solteiro ( ) Divorciado ( ) Viúvo
- 6) Peso atual: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_  
Mudança de peso no último ano: \_\_\_\_\_
- 7) Com que idade iniciou desenvolveu obesidade/sobrepeso? \_\_\_\_\_
- 8) O (A) Sr.(a) já teve histórico de obesidade e/ou sobrepeso na infância e/ou adolescência? ( )  
SIM ( ) NÃO
- 9) Já fez cirurgia bariátrica? ( ) NÃO ( ) SIM, há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- 10) Histórico doenças crônicas:  
( ) Hipertensão ( ) Problemas cardíacos ( ) Câncer, localização do tumor: \_\_\_\_\_  
( ) Dislipidemia ( ) Diabetes tipo 2 ( ) Apneia do sono  
( ) Outra doença crônica, Qual(is): \_\_\_\_\_
- 11) Histórico familiar: algum familiar apresentou alguma das doenças citadas na questão anterior?  
\_\_\_\_\_
- 12) Horário que costuma dormir e acordar:  
Horário que dorme: \_\_\_\_\_ Horário que acorda: \_\_\_\_\_
- 13) Frequência intestinal: ( ) 1x ao dia ( ) a cada 2-3 dias ( ) constipado, que frequência: \_\_\_\_\_
- 14) Sofre de insônia:  
a. ( ) SIM, acorda quantas vezes na noite: \_\_\_\_\_ que horário (s): \_\_\_\_\_  
b. ( ) NÃO
- 15) Fatores socioeconômicos:  
a. Grau de escolaridade

- i. Ensino fundamental incompleto ou completo ( )
- ii. Ensino médio incompleto ou completo ( )
- iii. Ensino superior incompleto ou mais escolaridade ( )

**16) Tabagismo:**

( ) Não-tabagista ( ) Tabagista – quantos cigarros/dia: ..... ( ) Ex-tabagista

**17) Abuso de bebida alcoólica**

- a. ( ) NÃO, Abstêmio
- b. ( ) SIM, bebe menos de 3 doses semanais de destilados ou 3 garrafas de fermentados
- c. ( ) SIM, com abuso de bebida alcoólica
  - i. ( ) de 3 a 7 doses semanais de destilados ou 7 garrafas de fermentados
  - ii. ( ) Acima de 7 doses semanais de destilados ou 7 garrafas de fermentados

**18) Uso de suplementação dietética e de micronutrientes (polivitamínico):**

**19) Está seguindo as orientações nutricionais? ( ) SIM ( ) NÃO**

**20) Hábitos alimentares: Dentre os alimentos a seguir, o quanto você gosta? “pouco (P)”, “moderado (MD)” e “muito (MT)”**

( ) Doces, bolos, chocolates ( ) Massas, pães, pizza ( ) Refrigerantes, sucos adoçados

**21) Alguma medicação de uso não diário/habitual utilizada entre os dias de ontem e hoje? (ex.: anti-inflamatórios, calmantes...)**

---



---



---

**22) Realiza atividade física: ( ) SIM ( ) NÃO**

- Frequência da atividade física: \_\_\_\_\_
- Tipo de atividade física: \_\_\_\_\_

## ANEXO D – Questionário aplicado no grupo controle

### QUESTIONÁRIO CONTROLES

Data da entrevista:

Entrevistador(a):

- 1) Nome Completo:
- 2) Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_
- 3) Sexo: (M) (F)
- 4) Estado Civil: ( ) Casado ou União Estável ( ) Solteiro ( ) Divorciado ( ) Viúvo
- 5) Peso atual: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_  
Mudança de peso no último ano: \_\_\_\_\_
- 6) Tem histórico de obesidade ou sobrepeso? ( ) NÃO ( ) SIM  
(Fator de exclusão)
- 7) Tem histórico familiar de obesidade ou sobrepeso? ( ) NÃO ( ) SIM  
\_\_\_\_\_
- 8) Já fez cirurgia bariátrica? ( ) NÃO ( ) SIM  
(Fator de exclusão)
- 9) Já teve alguma gestação? ( ) NÃO ( ) SIM, quantas \_\_\_\_\_
- 10) Possui alguma doença crônica? ( ) NÃO ( ) SIM, qual  
\_\_\_\_\_
- 11) Doenças autoimunes ou alergias? ( ) NÃO ( ) SIM, qual(is)  
\_\_\_\_\_  
(Doença autoimune é fator de exclusão)
- 12) Algum familiar possui alguma das doenças a seguir? (excluir caso o participante tenha alguma das doenças)  
( ) Hipertensão ( ) Problemas cardíacos ( ) Câncer, localização do tumor: \_\_\_\_\_  
( ) Dislipidemia ( ) Diabetes tipo 2 ( ) Apneia do sono  
( ) Outra doença crônica, Qual(is): \_\_\_\_\_
- 13) Horário que costuma dormir e acordar:  
Horário que dorme: \_\_\_\_\_ Horário que acorda: \_\_\_\_\_
- 14) Frequência intestinal: ( ) 1x ao dia ( ) a cada 2-3 dias ( ) constipado, que frequência: \_\_\_\_\_
- 15) Sofre de insônia:
  - a. ( ) SIM, acorda quantas vezes na noite: \_\_\_\_\_ que horário (s): \_\_\_\_\_
  - b. ( ) NÃO
- 16) Fatores socioeconômicos:
  - a. Grau de escolaridade

- i. Ensino fundamental incompleto ou completo ( )
- ii. Ensino médio incompleto ou completo ( )
- iii. Ensino superior incompleto ou mais escolaridade ( )

**17) Tabagismo:**

( ) Não-tabagista ( ) Tabagista – quantos cigarros/dia: ..... ( ) Ex-tabagista

**18) Abuso de bebida alcoólica**

- a. ( ) NÃO, Abstêmio
- b. ( ) SIM, bebe menos de 3 doses semanais de destilados ou 3 garrafas de fermentados
- c. ( ) SIM, com abuso de bebida alcoólica
  - i. ( ) de 3 a 7 doses semanais de destilados ou 7 garrafas de fermentados
  - ii. ( ) Acima de 7 doses semanais de destilados ou 7 garrafas de fermentados

**19) Medicções de uso contínuo:** \_\_\_\_\_

**20) Uso de suplementação dietética e de micronutrientes (polivitamínico):**

\_\_\_\_\_

**21) Restrições alimentares?** ( ) NÃO ( ) SIM, qual \_\_\_\_\_

**22) Hábitos alimentares:** Dentre os alimentos a seguir, o quanto você gosta? “pouco (P)”, “moderado (MD)” e “muito (MT)”

( ) Doces, bolos, chocolates ( ) Massas, pães, pizza ( ) Refrigerantes, sucos adoçados

**23) Alguma medicação de uso não diário/habitual utilizada entre os dias de ontem e hoje? (ex.: anti-inflamatórios, calmantes...)**

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**24) Realiza atividade física:** ( ) SIM ( ) NÃO

- Frequência da atividade física: \_\_\_\_\_
- Tipo de atividade física: \_\_\_\_\_